

PCT/JP2004/012238

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

19.08.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 7月29日

出 願 番 号
Application Number: 特願2004-222441
[ST. 10/C]: [JP2004-222441]

REC'D 07 OCT 2004	
WIPO	PCT

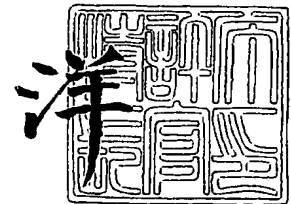
出 願 人
Applicant(s): タカラバイオ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3085985

【書類名】 特許願
【整理番号】 T-1903
【提出日】 平成16年 7月29日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 5/00
C12N 5/08
A61K 35/00

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 出野 美津子

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 村木 信子

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 小川 衣子

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 岸本 真幸

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 榎 竜嗣

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 佐川 裕章

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】
【識別番号】 302019245
【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社
【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 173212
【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

培地中における血清および血漿の総含有濃度が 0～5%未満である培地を用いて、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養から選択される少なくとも 1 つを行う工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法。

【請求項 2】

細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、インターロイキン-2 レセプターを高発現するものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、CD 8 陽性細胞を高比率で含有するものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いた細胞傷害性リンパ球の製造方法と比較して、拡大培養率が高い方法である請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、細胞傷害活性が増強されたもしくは高い細胞傷害活性が維持されたものである請求項 1～4 に記載の方法。

【請求項 6】

フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固相に固定化されてなるものである請求項 1～5 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

固相が細胞培養用器材または細胞培養用担体である請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

細胞培養用器材がシャーレ、フラスコまたはバッグであり、細胞培養用担体がビーズ、メンブレンまたはスライドガラスである請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

細胞傷害性リンパ球がリンフォカイン活性化キラー細胞である請求項 1～8 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号 1～7 で表されるアミノ酸配列を少なくとも 1 つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に 1 以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドである請求項 1～9 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

フィブロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものである請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号 8～19 で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドである請求項 10 記載の方法。

【請求項 13】

細胞培養用器材中を行なう請求項 1 記載の方法であって、

(a) 培養開始時の細胞数と細胞培養用器材における培養面積との比率が、 $1 \text{ cell} / \text{cm}^2 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells} / \text{cm}^2$ である、および／または

(b) 培養開始時の培地中の細胞の濃度が、 $1 \text{ cell/ml} \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ である、

の条件を満たす方法。

【請求項 14】

細胞培養液を希釈する工程を包含しない請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なくともいずれか1つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中に行なう請求項 1 記載の方法であって、少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含し、かつ少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程直後、培地を交換する工程直後もしくは細胞培養用器材を交換する工程直後の培養条件が

(c) 培養液中の細胞の濃度が $2 \times 10^5 \text{ cells/ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ である、もしくは

(d) 細胞培養用器材における培養面積との比率が $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/cm}^2$ である

のいずれかの条件を満たす方法。

【請求項 16】

細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なくともいずれか1つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中に行なう請求項 1 記載の方法であって、少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含し、かつ少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程直後、培地を交換する工程直後もしくは細胞培養用器材を交換する工程直後における培地中における血清および血漿の総含有濃度が培養開始時よりも低減されている請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

請求項 1～16 いずれか1項に記載の方法により得られる細胞傷害性リンパ球。

【請求項 18】

請求項 1～16 いずれか1項に記載の方法により得られる細胞傷害性リンパ球を有効成分として含有する医薬。

【請求項 19】

フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有し、かつ血清および血漿の濃度が0～5%未満であることを特徴とする細胞傷害性リンパ球培養用培地。

【請求項 20】

細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む請求項 1～16 いずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】

外来遺伝子をレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスを用いて導入する請求項 20 記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞傷害性リンパ球の製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療分野において有用な、細胞傷害性リンパ球を取得する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体は主として免疫応答により異物から守られており、免疫システムはさまざまな細胞とそれが作り出す可溶性の因子によって成り立っている。なかでも中心的な役割を果たしているのが白血球、特にリンパ球である。このリンパ球はBリンパ球（以下、B細胞と記載することがある）とTリンパ球（以下、T細胞と記載することがある）という2種類の主要なタイプに分けられ、いずれも抗原を特異的に認識し、これに作用して生体を防御する。

【0003】

T細胞は、CD (Cluster Designation) 4マーカーを有し、主に抗体産生の補助や種々の免疫応答の誘導に関与するヘルパーT細胞（以下、 T_H と記載する）、CD8マーカーを有し、主に細胞傷害活性を示す細胞傷害性T細胞（ T_C ；細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T lymphocyte)、キラーT細胞とも呼ばれる。以下、CTLと記載することがある）に亜分類される。腫瘍細胞やウイルス感染細胞等を認識して破壊、除去するのに最も重要な役割を果たしているCTLは、B細胞のように抗原に対して特異的に反応する抗体を産生するのではなく、標的細胞膜表面上に存在する主要組織適合複合体 [MHC；ヒトにおいてはヒト白血球抗原 (HLA) と称することもある] クラスI分子に会合した標的細胞由来の抗原（抗原ペプチド）を直接認識して作用する。この時、CTL膜表面のT細胞レセプター（以下、TCRと称す）が前述した抗原ペプチドおよびMHCクラスI分子を特異的に認識して、抗原ペプチドが自己由来のものなのか、あるいは、非自己由来のものなのかを判断する。そして、非自己由来と判断された標的細胞はCTLによって特異的に破壊、除去される。

【0004】

近年、薬剤治療法や放射線治療法のように患者に重い肉体的負担がある治療法が見直され、患者の肉体的負担が軽い免疫治療法への関心が高まっている。特に免疫機能が正常なヒト由来のリンパ球から目的とする抗原に対して特異的に反応するCTLを生体外（イン・ビトロ、in vitro）で誘導した後、もしくは誘導を行わず、リンパ球を拡大培養し、患者へ移入する養子免疫療法の有効性が注目されている。例えば、動物モデルにおいて養子免疫療法がウイルス感染および腫瘍に対して有効な治療法であることが示唆されている（例えば、非特許文献1及び非特許文献2）。この治療法ではCTLの抗原特異的傷害活性を維持もしくは増強させた状態でその細胞数を維持あるいは増加させることが重要である。

【0005】

上記のような養子免疫療法において、治療効果を得るためには一定量以上の細胞数の細胞傷害性リンパ球を投与する必要がある。すなわち、イン・ビトロでこれらの細胞数を短時間に得ることが最大の問題であるといえる。

【0006】

CTLの抗原特異的傷害活性を維持および増強するためには、CTLについて抗原に特異的な応答を誘導する際に、目的とする抗原を用いた刺激を繰り返す方法が一般的である。しかし、通常、この方法では最終的に得られるCTL数が減少し、十分な細胞数が得られない。

【0007】

疾病の治療に有効なT細胞を調製する方法としては、例えば、リンフォカイン活性化キラー細胞 (LAK細胞) を用いる養子免疫療法（例えば、非特許文献3）、高濃度のインターロイキン-2 (IL-2) を用いて誘導した腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を用いる養

子免疫療法（例えば、非特許文献4および非特許文献5）が知られている。

【0008】

次に、抗原特異的なCTLの調製に関しては、自己CMV感染線維芽細胞とIL-2（例えば、非特許文献6）、あるいは抗CD3モノクローナル抗体（抗CD3mAb）とIL-2を用いて、それぞれCMV特異的CTLクローンを単離ならびに大量培養する方法（例えば、非特許文献7）が報告されている。

【0009】

さらに、特許文献1にはREM法（rapid expansion method）が開示されている。このREM法は、抗原特異的CTLおよびT_Hを含むT細胞の初期集団を短期間で増殖（Expand）させる方法である。つまり、個々のT細胞クローンを増殖させて大量のT細胞を提供可能であり、抗CD3抗体、IL-2、並びに放射線照射により増殖性をなくしたPBMC（peripheral blood mononuclear cell、末梢血単核細胞）とエプスタイン・バーウイルス（Epstein-Barr virus、以下EBVと略す）感染細胞とを用いて抗原特異的CTL数を増加させることが特徴である。

【0010】

また、特許文献2には改変REM法が開示されており、当該方法はPBMCとは区別されるT細胞刺激成分を発現する分裂していない哺乳動物細胞株をフィーダ細胞として使用し、PBMCの使用量を低減させる方法である。

【0011】

リンフォカイン活性化キラー細胞（LAK細胞）は、リンパ球を含む末梢血液（末梢血白血球）や臍帯血、組織液等にIL-2を加えて、数日間試験管内で培養することにより得られる細胞傷害活性を持つ機能的細胞集団である。この際、抗CD3抗体を加えて培養することにより、さらにLAK細胞の増殖は加速する。このようにして得られたLAK細胞は非特異的にさまざまながん細胞やその他のターゲットに対して傷害活性を有する。LAK細胞も上記CTLと同様に、養子免疫療法に使用される。

【0012】

上記のとおり、細胞傷害性リンパ球、例えばCTL、LAK細胞、TIL等を取得する工程においてはIL-2の利用を欠かすことができない。IL-2が細胞表面のインターロキニン-2レセプター（IL-2R）に結合することにより細胞はさらに活性化される。また、IL-2Rはリンパ球の活性化マーカーとして知られている。これらの点において、細胞表面のIL-2Rの発現を上昇させることは重要である。また、CTLの誘導においては、抗原による刺激に供されたCTLの前駆細胞がCTLとして誘導される効率を向上させること、すなわち、誘導後の細胞群におけるCD8陽性細胞の割合（比率）を向上させることが重要である。

【0013】

またこれらリンパ球を体外において拡大培養する際には通常血清または血漿が5%から20%添加される。この血清・血漿はリンパ球等の細胞をイン・ビトロで培養する際に必要とされる成分であるが、血清・血漿は非自己動物（ヒト・ウシ等）の血液をその由来とするため各種ウイルス感染等の危険性が排除できない。また、現在の検出技術では検出することが出来ないようなウイルス・病原性微生物の存在を完全否定することは不可能である。

【0014】

この観点から、近年、患者由来の血清・血漿（自己血清・血漿）の使用が進められている。しかし、培養に必要な量の血清・血漿を確保するために疾患患者自身の血液を多量に採取することは、患者への肉体的負担が大きく、生命の危険につながる可能性もある。この危険を回避するため、少量の血清・血漿を用いて、治療に必要なリンパ球を得る拡大培養を行うと必然的に低濃度血清・血漿での培養となる。一般にリンパ球等の細胞は低血清・低血漿条件における培養では増殖が不安定となり治療に必要な量の細胞が得られない。さらに、上述の肉体的負担および感染の危険性を回避するためには無血清培養が強く求め

られるが、このような培養条件ではほとんどの細胞が増殖しなくなる。

【0015】

このため、低血清・無血清（低血漿・無血漿）でのリンパ球拡大培養方法が強く求められている。

【0016】

無血清（無血漿）条件下でのリンパ球拡大培養方法が確立されれば、血清・血漿のロット間の差を排除でき、疾患患者血清・血漿に由来する負要因（免疫抑制成分等）を排除することが出来ることから、この系の確立によって得られる利益は計り知れない。

【0017】

フィブロネクチンは動物の血液中、培養細胞表面、組織の細胞外マトリックスに存在する分子量25万の巨大な糖タンパク質であり、多彩な機能を持つことが知られている。そのドメイン構造は7つに分けられており（以下、図1参照）、またそのアミノ酸配列中には3種類の類似の配列が含まれており、これら各配列の繰返しで全体が構成されている。3種類の類似の配列はI型、II型、III型と呼ばれ、このうち、III型はアミノ酸残基71～96個のアミノ酸残基で構成されており、これらのアミノ酸残基の一致率は17～40%である。フィブロネクチン中には14のIII型の配列が存在するが、そのうち、8番目、9番目、10番目（以下、それぞれIII-8、III-9、III-10と称する。）は細胞結合ドメインに、また12番目、13番目、14番目（以下、それぞれIII-12、III-13、III-14と称する。）はヘパリン結合ドメインに含まれている。また、III-10にはVLA（very late activation antigen）-5結合領域が含まれており、このコア配列はRGDSである。また、ヘパリン結合ドメインのC末端側にはIIICSと呼ばれる領域が存在する。IIICSには25アミノ酸からなるVLA-4に対して結合活性を有するCS-1と呼ばれる領域が存在する（例えば、非特許文献8、非特許文献9および非特許文献10）。

【0018】

【非特許文献1】Greenberg, P. D. 著, 1992年発行, *Advances in Immunology*

【非特許文献2】Reusser P. 他3名, *Blood*, 1991年, Vol. 78, No. 5, P1373～1380

【非特許文献3】Rosenberg S. A. 他, *N. Engl. J. Med.* 1987年, Vol. 316, No. 15, P889～897

【非特許文献4】Rosenberg S. A. 他, *N. Engl. J. Med.* 1988年, Vol. 319, No. 25, P1676～1680

【非特許文献5】Ho M. 他9名, *Blood*, 1993年, Vol. 81, No. 8, P2093～2101

【非特許文献6】Riddell S. A. 他4名, *J. Immunol.*, 1991年, Vol. 146, No. 8, P2795～2804

【非特許文献7】Greenberg P. D. 他1名, *J. Immunol. Methods*, 1990年, Vol. 128, No. 2, P189～201

【非特許文献8】Deane F. Momer著, 1988年発行, *FIBROBLAST ACTIN*, ACADEMIC PRESS INC., P1～8

【非特許文献9】Kimizuka F. 他8名, *J. Biochem.*, 1991年, Vol. 110, No. 2, p284～291

【非特許文献10】Hananberg H. 他5名, *Human Gene Therapy*, 1997年, Vol. 8, No. 18, p2193～2206

【特許文献1】国際公開第96/06929号パンフレット

【特許文献2】国際公開第97/32970号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明の目的は、安全性が高く、医療への使用に適した、細胞傷害活性を高いレベルで保持した細胞傷害性リンパ球を取得する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、培地中における血清および血漿の総含有濃度が0～5%未満である培地を用いて、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養から選択される少なくとも1つを行う工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法に関する。本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、インターロイキン-2レセプターを高発現する細胞傷害性リンパ球が例示される。また、本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、CD8陽性細胞を高比率で含有する細胞傷害性リンパ球が例示される。また、本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いた細胞傷害性リンパ球の製造方法と比較して、拡大培養率が高い細胞傷害性リンパ球が例示される。また、本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を含まない培地を用いて製造されたものと比較して、細胞傷害活性が増強されたもしくは高い細胞傷害活性が維持された細胞傷害性リンパ球が例示される。

【0021】

本発明の第1の発明において、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の使用については、これらが固相に固定化されて使用されることが例示される。ここで固相としては細胞培養用器材または細胞培養用担体が例示される。細胞培養用器材としては、シャーレ、フラスコまたはバッグが例示され、細胞培養用担体としては、ビーズ、メンブレンまたはスライドガラスが例示される。

【0022】

本発明の第1の発明において、細胞傷害性リンパ球としては、リンフォカイン活性化キラー細胞が例示される。

【0023】

本発明の第1の発明において、フィブロネクチンのフラグメントとしては、配列表の配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであるか、または前記ポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドが例示される。フィブロネクチンのフラグメントとしては、細胞接着活性および/またはヘパリン結合活性を有するものが例示される。また、フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号8～19で表されるアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドより選択されるポリペプチドが例示される。

【0024】

本発明の第1の発明において、当該製造方法を細胞培養用器材中で行う場合の一態様として、

(a) 培養開始時の細胞数と細胞培養用器材における培養面積との比率が、 $1\text{ cell}/\text{cm}^2 \sim 5 \times 10^5\text{ cells}/\text{cm}^2$ である、および/または

(b) 培養開始時の培地中の細胞の濃度が、 $1\text{ cell}/\text{ml} \sim 5 \times 10^5\text{ cells}/\text{ml}$ である、

のいずれかの条件を満たすことが例示される。

また、このような製造方法としては、細胞培養液を希釈する工程を包含しない方法が例示される。

【0025】

本発明の第1の発明において、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なく

ともいずれか1つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で行なう場合、例えば、少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含し、かつ少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程直後、培地を交換する工程直後もしくは細胞培養用器材を交換する工程直後の培養条件が

(c) 培養液中の細胞の濃度が $2 \times 10^5 \text{ cells/ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ である、もしくは

(d) 細胞培養用器材における培養面積との比率が $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/cm}^2$ である

のいずれかの条件を満たすことが例示される。

【0026】

本発明の第1の発明の製造方法において、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なくともいずれか1つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で行なう場合、特に限定はないが、例えば、少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含し、かつ少なくとも1回の細胞培養液を希釈する工程直後、培地を交換する工程直後もしくは細胞培養用器材を交換する工程直後における培地中の血清および血漿の総含有濃度が培養開始時よりも低減されていることが例示される。

【0027】

本発明の第1の発明において、細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む方法が例示される。ここで外来遺伝子の導入としては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスを用いて導入することが例示される。

【0028】

本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球に関する。

【0029】

本発明の第3の発明は本発明の第1の発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球を有効成分として含有する医薬に関する。

【0030】

本発明の第4の発明は、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有し、かつ血清および血漿の総含有濃度が0～5%未満であることを特徴とする細胞傷害性リンパ球培養用培地に関する。

【発明の効果】

【0031】

本発明により、安全性が高く、患者への負担が軽減された細胞傷害性リンパ球の製造方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

本発明は、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持又は拡大培養方法において、フィブロネクチン及び/又はフィブロネクチンフラグメントの存在下に細胞傷害性リンパ球を調製することにより、培地中の血清や血漿の含有量を低減または除去しても、高い拡大培養率で十分な細胞傷害活性を有し、IL-2Rの発現量が高く、さらにCD8陽性細胞の比率が高い細胞傷害性リンパ球が得られることを見出し、完成するに至ったものである。

【0033】

なお、本明細書において細胞傷害性リンパ球の製造とは、当該細胞の誘導（活性化）、維持、拡大培養の各工程、もしくはこれらを組み合わせた工程を包含する工程を指す。また、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造を、細胞傷害性リンパ球の培養とも称する。

【0034】

以下、本発明を具体的に説明する。

(1) 本発明に使用されるフィブロネクチン、およびそのフラグメント

本明細書中に記載のフィブロネクチンおよびそのフラグメントは、天然から得られたもの、または人為的に合成されたもののいずれでもよい。フィブロネクチンおよびそのフラグメントは、例えば、ルオスラーティ E. ら [Ruoslahti E., et al., ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 第256巻、第14号、第7277~7281頁 (1981)] の開示に基づき、天然起源の物質から実質的に純粋な形態で製造することができる。ここで、本明細書に記載された実質的に純粋なフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントとは、これらが天然においてフィブロネクチンと一緒に存在する他のタンパク質を本質的に含有していないことを意味する。上記のフィブロネクチンおよびそのフラグメントは、それぞれ単独で、もしくは複数の種類のものを混合して本発明に使用することができる。

【0035】

本発明に使用できるフィブロネクチンフラグメント、ならびに該フラグメントの調製に関する有用な情報は、キミヅカ F. ら [Kimiduka F., et al., ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 第110巻、第284~291頁 (1991)]、コーンブリット A. R. ら [Kornbritt A. R., et al., EMBO ジャーナル (EMBO J.), 第4巻、第7号、1755~1759 (1985)]、およびセキグチ K. ら [Sekiguchi K., et al., バイオケミストリー (Biochemistry), 第25巻、第17号、4936~4941 (1986)] 等より得ることができる。

【0036】

本発明においては、フィブロネクチンフラグメントとしては、例えば、少なくとも I I I-8 (配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列)、I I I-9 (配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列)、I I I-10 (配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列)、I I I-12 (配列表の配列番号4で表されるアミノ酸配列)、I I I-13 (配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列)、I I I-14 (配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列)、および C S-1 (配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列) のいずれかの領域を構成するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド (図1参照) が例示される。

【0037】

また、当該フラグメントとしては、細胞接着活性および/またはヘパリン結合活性を有するものが好適に使用できる。細胞接着活性は、本発明で使用されるフラグメント (その細胞結合ドメイン) と細胞との結合を公知の方法を使用してアッセイすることにより調べることができる。例えば、このような方法には、ウィリアムズ D. A. らの方法 [Williams D. A., et al., ネイチャー (Nature), 第352巻、第438~441頁 (1991)] が含まれる。当該方法は、培養プレートに固定化したフラグメントに対する細胞の結合を測定する方法である。また、ヘパリン結合活性は、本発明に使用されるフラグメント (そのヘパリン結合ドメイン) とヘパリンとの結合を公知の方法を使用してアッセイすることにより調べることができる。例えば、上記のウィリアムズ D. A. らの方法において、細胞に換えてヘパリン、例えば標識ヘパリンを使用することにより、同様の方法でフラグメントとヘパリンとの結合の評価を行うことができる。

【0038】

さらにフィブロネクチンのフラグメントとしては、C-274 (配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列)、H-271 (配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列)、H-296 (配列表の配列番号10で表されるアミノ酸配列)、CH-271 (配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列)、CH-296 (配列表の配列番号12で表されるアミノ酸配列)、または C-C S1 (配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列) より選択されるポリペプチドが例示される。

【0039】

上記のCH-271、CH-296、C-274、C-CS1の各フラグメントはVLA-5に結合する活性を有する細胞結合ドメインを有するポリペプチドである。また、C-CS1、H-296、CH-296はVLA-4に結合する活性を有する細胞結合ドメインを有するポリペプチドである。さらに、H-271、H-296、CH-271およびCH-296はヘパリン結合ドメインを有するポリペプチドである。

【0040】

本発明においては、上記の各ドメインが改変されたフラグメントも使用することができる。フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインは3つのIII型配列(III-12、III-13、III-14)によって構成されている。前記III型配列のうちの一つもしくは二つを欠失したヘパリン結合ドメインを含むフラグメントも本発明に使用することが可能である。例えば、フィブロネクチンの細胞結合部位(VLA-5結合領域、Pro1239~Ser1515)と一つのIII型配列とが結合したフラグメントであるCHV-89(配列表の配列番号14で表されるアミノ酸配列)、CHV-90(配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列)、CHV-92(配列表の配列番号16で表されるアミノ酸配列)、あるいは二つのIII型配列とが結合したフラグメントであるCHV-179(配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列)、CHV-181(配列表の配列番号18で表されるアミノ酸配列)が例示される。CHV-89、CHV-90、CHV-92はそれぞれIII-13、III-14、III-12を含むものであり、CHV-179はIII-13とIII-14を、CHV-181はIII-12とIII-13をそれぞれ含んでいる。

【0041】

また、上記の各フラグメントにさらにアミノ酸を付加したフラグメントも本発明に使用することができる。当該フラグメントは、例えば、後述の製造例に記載のH-275-Cysの製造方法に準じて上記各フラグメントに所望のアミノ酸を付加することにより製造可能である。例えば、H-275-Cys(配列表の配列番号19で表されるアミノ酸配列)は、フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインを有し、かつC末端にシステイン残基を有するフラグメントである。

【0042】

なお、本発明に使用されるフラグメントとしては、本発明の所望の効果が得られる限り、上記に例示した天然のフィブロネクチンのアミノ酸配列の少なくとも一部を含むフラグメントと同等な機能を有する、当該フラグメントを構成するポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入若しくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドからなるものであってもよい。

【0043】

アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチドの機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチドの物理化学的性状等を変化させ得る程度のものであるのが好ましい。例えば、アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチドの持つ性質(例えば、疎水性、親水性、電荷、pK等)を実質的に変化させない範囲の保存的なものである。例えば、アミノ酸の置換は、1. グリシン、アラニン; 2. バリン、イソロイシン、ロイシン; 3. アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン; 4. セリン、スレオニン; 5. リジン、アルギニン; 6. フェニルアラニン、チロシンの各グループ内での置換であり、アミノ酸の欠失、付加、挿入は、ポリペプチドにおけるそれらの対象部位周辺の性質に類似した性質を有するアミノ酸の、対象部位周辺の性質を実質的に変化させない範囲での欠失、付加、挿入である。

【0044】

また、「同等な機能を有する」とは、フィブロネクチンフラグメントを有する、(i) 細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性の増強又は維持機能、(ii) IL-2Rの発現量の増強機能、または(iii) CD8陽性細胞の比率向上機能、(iv) 細胞傷害性リンパ球の拡大培養率の向上の少なくともいずれかの機能を有することをいう。アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントが、それらの機能を有するかについては後

述の実施例に記載の方法に準じて適宜確認することができる。また、アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントとしては、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものが好適である。細胞接着活性およびヘパリン結合活性は、それらの前記活性測定方法に準じて評価することができる。

【0045】

アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントとして、例えば、2つの異なるドメイン間にリンカーとして1以上のアミノ酸が挿入されたフラグメントも本発明に使用することができる。

【0046】

なお、フィブロネクチン自体についても、上記のフラグメントと同様、そのポリペプチドのアミノ酸配列に1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、少なくとも前記(i)～(iii)のいずれかの機能を有するポリペプチドを、本発明において使用することができる。

【0047】

本明細書中に記載のフィブロネクチンフラグメントは、例えば、米国特許第5,198,423号明細書の記載に基づいて遺伝子組換え体より製造することもできる。例えば、上記のH-271(配列番号9)、H-296(配列番号10)、CH-271(配列番号11)、CH-296(配列番号12)の各フラグメントならびにこれらを取得する方法は当該特許明細書に詳細に記載されている。また、上記のC-274(配列番号8)フラグメントは米国特許第5,102,988号明細書に記載された方法により得ることができる。さらに、C-CS1(配列番号13)フラグメントは日本特許第3104178号明細書に記載された方法により得ることができる。上記CHV-89(配列番号14)、CHV-90(配列番号15)、CHV-179(配列番号17)の各フラグメントは、日本特許第2729712号明細書に記載された方法により得ることができる。また、CHV-181(配列番号18)フラグメントは国際公開第97/18318号パンフレットに記載された方法に準じて得ることができる。CHV-92(配列番号16)フラグメントは、日本特許第2729712号明細書および国際公開第97/18318号パンフレットを参照し、それらの文献に記載されたプラスミドに基づいて定型的にプラスミドを構築し、該プラスミドを用いて遺伝子工学的に取得することができる。

【0048】

これらのフラグメントまたはこれらフラグメントから定型的に誘導できるフラグメントは、〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに下記受託番号のもとで寄託された微生物を用いて製造する、あるいは各微生物の保持するプラスミドを公知の方法により改変することにより製造することができる；

FERM BP-2264 (H-271をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
FERM BP-2800 (CH-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
FERM BP-2799 (CH-271をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
FERM BP-7420 (H-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
FERM BP-1915 (C-274をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
FERM BP-5723 (C-CS1をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
FERM P-12182 (CHV-89をコードするプラスミドを保有する大腸菌)、
FERM P-12183 (CHV-179をコードするプラスミドを保有する大腸菌)

。

【0049】

フィブロネクチンは巨大な糖タンパク質であるため、天然起源のタンパク質を調製して使用することは産業上および医薬品製造上、必ずしも容易ではない。また、フィブロネクチンは多機能タンパク質であることから、その使用の状況によっては、本発明の方法に効果を示す領域とは異なる領域に起因する不都合が起こることも考えられる。これらのことから、本発明においては、入手、取り扱いの容易さ、安全面の観点から、好適にはフィブ

ロネクチンフラグメント、さらに好適には前記のようにして得られる組換えフィブロネクチンフラグメントを使用することができる。さらに、後述するリンパ球の拡大培養率の向上、拡大培養されたリンパ球におけるIL-2Rの発現量の上昇、および拡大培養されたリンパ球集団中のCD8陽性細胞の比率の向上、細胞傷害活性の上昇等の効果を示すことができるフィブロネクチンフラグメントが特に好適に使用できる。また、本発明に使用されるフィブロネクチンフラグメントの分子量としては、特に限定はないが、好適には1~200kD、より好適には5~190kD、さらに好適には10~180kDである。

【0050】

(2) 本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法

以下、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法について具体的に説明する。本発明の方法は、前記した培地中における血清及び血漿の濃度が0~5%未満である培地を用いて、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なう細胞傷害性リンパ球の製造方法である。

【0051】

本明細書において細胞傷害性リンパ球とは細胞傷害性リンパ球を含有する細胞群を意味する。なお、狭義には前記細胞群に含有されている細胞傷害性リンパ球のみを示すことがある。また、本発明において細胞傷害性リンパ球の製造とは、本発明の細胞傷害性リンパ球になり得る前駆細胞からの細胞傷害活性を有するリンパ球への誘導、細胞傷害性リンパ球の維持、細胞傷害性リンパ球および/または前駆細胞を用いた細胞傷害性リンパ球の拡大培養のいずれをも包含するものである。

【0052】

本発明の細胞傷害性リンパ球としては、特に限定するものではないが、例えば細胞傷害活性を有する、リンフォカイン活性化キラー細胞(LAK細胞)、細胞傷害性T細胞(CTL)、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、NK細胞等が挙げられる。

【0053】

本発明において、細胞傷害性リンパ球になり得る、すなわち、該リンパ球への分化能を有する前駆細胞としては、PBMC、NK細胞、ナイーブ細胞、メモリー細胞、造血幹細胞、臍帯血単核球等が例示される。また、血球系細胞であれば本発明において前駆細胞として使用できる。これらの細胞は生体から採取されたものをそのままもしくは凍結保存したもののいずれも使用することができる。なお、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法では、前記細胞を含有する材料、例えば、末梢血液、臍帯血等の血液や、血液から赤血球や血漿等の成分を除去したもの、骨髓液等を使用することができる。

【0054】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法は、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物から選択される有効成分の存在下に細胞傷害性リンパ球を製造することを1つの大きな特徴とする。

【0055】

さらに、従来の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法では、培地中に5~20%の血清・血漿の添加が必要であったのに対し、本発明の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法は、これら血清および血漿の培地中の総含有濃度を0~5%未満とすることを特徴とする。血清および血漿の培地中の総含有濃度は、好適には0~4%、特に好適には0~3%とすることができる。本発明の特に好適な態様においては、培地中に血清・血漿を全く添加することなく、十分な細胞傷害性リンパ球の拡大培養を行うことができ、安全面や患者への負担を軽減させる点で非常に有用な方法である。また、本発明において、使用する血清・血漿の使用量をさらに低減させたい場合は、培養途中において血清・血漿の使用量を段階的に低減させることができる。すなわち、培養開始時の血清・血漿濃度に対して、後述する細胞培養液の希釈、培地交換もしくは細胞培養用器材の交換のタイミングで使用される新たな培地中の血清・血漿濃度を低減させるもしくは添加しないことで、血清・血漿の使用量を通常より低減させることができる。なお、血清又は血漿の由来としては、自己(使用す

る細胞傷害性リンパ球の前駆細胞と由来が同じであることを意味する) もしくは非自己(使用する細胞傷害性リンパ球の前駆細胞と由来が異なることを意味する)のいずれでも良いが、好適には安全性の観点から自己由来のものが使用できる。

【0056】

本発明の方法において、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および/または拡大培養は、通常、本発明の前記有効成分の存在下に、所定の成分を含む培地中で行なわれる。

【0057】

例えば、本発明の方法において、細胞傷害性リンパ球の誘導もしくは拡大培養を意図する場合、本発明において使用される培養開始時の細胞(細胞傷害性リンパ球および/または前駆細胞)数としては、特に限定はないが、例えば $1 \text{ cell/ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ 、好適には $1 \text{ cell/ml} \sim 5 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ 、さらに好適には $1 \text{ cell/ml} \sim 2 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ が例示される。また、培養条件に特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができる。例えば、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で細胞培養液を新鮮な培地に希釈するか、培地を交換するか、もしくは細胞培養用器材を交換することができる。

【0058】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法において使用される培地には血清、血漿の含有量を除いては特に限定はなく、細胞傷害性リンパ球、その前駆細胞の維持、生育に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、たとえば市販の培地を適宜選択して使用することができる。これらの培地はその本来の構成成分以外に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の成分を含んでいてもよい。好適には、IL-2を含有する培地が本発明に使用される。IL-2の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば、好適には $0.01 \sim 1 \times 10^5 \text{ U/ml}$ 、より好適には $0.1 \sim 1 \times 10^4 \text{ U/ml}$ である。

【0059】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法において使用される細胞培養用器材としては、特に限定はないが、例えば、シャーレ、フラスコ、バッグ、大型培養槽、バイオリアクター等を使用することができる。なお、バッグとしては、下記実施例34～38および45～52に記載のとおり、細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグを使用することができる。また、工業的に大量のリンパ球を製造する場合には、大型培養槽を使用することができる。また、培養は開放系、閉鎖系のいずれのものも使用することができるが、好適には得られるリンパ球の安全性の観点から閉鎖系で培養を行うことが好ましい。

【0060】

また、抗CD3抗体をさらに含有する培地中で細胞傷害性リンパ球になり得る前駆細胞を培養することもできる。抗CD3抗体の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば $0.01 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ が好適である。抗CD3抗体はリンパ球上のレセプターを活性化する目的で添加することができる。また、この他、レクチン等のリンパ球刺激因子を添加することもできる。当該成分の培地中の濃度は、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

【0061】

なお、これらの成分は培地中に溶解して共存させる他、適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグ等の細胞培養用器材(開放系のもの、および閉鎖系のもののいずれをも含む)、またはビーズ、メンブレン、スライドガラス等の細胞培養用担体に固定化して使用してもよい。それらの固相の材質は細胞培養に使用可能なものであれば特に限定されるものではない。該成分を、例えば、前記器材に固定化する場合、培地を該器材に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、当該成分の固定化量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。前記担体は、細胞培養時に細胞培養用器材中の培養液に浸漬して使用される。前記成分を前記担体に固定化する場合

、該担体を培地に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、当該成分の固定化量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

【0062】

いずれの場合も前記成分の固定化は、公知の方法、例えば、後述するフィブロネクチンフラグメントの固定化方法に準じて行なうことができる。

【0063】

さらに、国際公開第02/14481号パンフレットに記載された、抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞の誘導に有効な酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖およびそれらの塩からなる群より選択される化合物や、下記(A)～(D)から選択される物質を前記成分と共に用いてもよい。

(A) CD44に結合活性を有する物質

(B) CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質

(C) 成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質

(D) 成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質

【0064】

前記CD44に結合活性を有する物質としては、例えばCD44リガンドおよび/または抗CD44抗体が例示される。CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の阻害剤又は活性化剤が挙げられる。成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質としては、例えば成長因子に結合活性を有し、成長因子と複合体を形成することにより成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質、もしくは成長因子レセプターに結合活性を有し、成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質が挙げられる。さらに、成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の阻害剤又は活性化剤が挙げられる。これらの成分の培地中の濃度は、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。また、これらの成分は培地中に溶解して共存させる他、前記のような適切な固相に固定化して使用してもよい。

なお、上記の各種物質は単独で、もしくは2種以上混合して用いることができる。

【0065】

本発明において前記有効成分の存在下とは、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持または拡大培養を行なう際に、前記有効成分がその機能を発揮し得る状態で存在することをいい、その存在状態は特に限定されるものではない。例えば、有効成分を使用する培地に溶解させる場合、培養を行う培地中における、本発明の有効成分の含有量は所望の効果が得られれば特に限定するものではないが、例えば、好ましくは $0.001 \sim 10000 \mu\text{g/ml}$ 、より好ましくは $0.01 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ 、さらに好ましくは $0.1 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ である。なお、有効成分は、このように培地中に溶解して共存させる他、適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグ等の細胞培養用器材（開放系のもの、および閉鎖系のもののいずれをも含む）、またはビーズ、メンブレン、スライドガラス等の細胞培養用担体に固定化して使用してもよい。培養された細胞傷害性リンパ球を生体に投与する観点からは、特に限定はないが、前記有効成分を固定化して使用することが望ましい。

【0066】

前記の種々の成分や、本発明の有効成分を固相に固定化しておけば、本発明の方法により細胞傷害性リンパ球を得た後、該リンパ球と固相とを分離するのみで、有効成分等と該リンパ球とを容易に分離することができ、該リンパ球への有効成分等の混入を防ぐことができる。

【0067】

本発明の有効成分を、例えば、前記器材に固定化する場合、培地を該器材に入れた際に

、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。有効成分を前記担体に固定化する場合、該担体を培地に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

【0068】

例えば、フィブロネクチンのフラグメントの固定化は、国際公開第97/18318号パンフレット、ならびに国際公開第00/09168号パンフレットに記載の方法により実施することができる。

【0069】

本発明の製造方法によって得られた細胞傷害性リンパ球についてIL-2Rの発現量を測定すると、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なった細胞傷害性リンパ球に比較して有意なIL-2R発現量の増加が認められる。ここで、IL-2R発現量は公知の方法、例えば、抗IL-2R抗体を使用して測定することができる。

【0070】

上記のように、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球はIL-2Rの発現量が増加している。IL-2Rは活性化T細胞表面に発現する活性化マーカーであり、この分子の発現に伴い、サイトカイン産生、細胞傷害活性、増殖活性等が活性化される。よって、本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球は高い機能を有する細胞群である。

【0071】

また、本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球は、IL-2Rの発現量が増加していることから、培地中に添加されたIL-2、あるいは細胞傷害性リンパ球の前駆細胞、リンパ球自体もしくは共存するその他の細胞が産生したIL-2による刺激に対する感受性が向上している。このため、IL-2の少ない環境下（例えば体内等）でも自ら活性化することができる。

【0072】

さらに、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球では、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものに比べてCD8マーカーを有する（CD8陽性）細胞の存在する比率が高い。このことは、例えば、1. CD8陽性細胞はインターフェロン- γ 等のサイトカインを産生して、免疫賦活を引き起こし、ヘルパーT細胞バランスをTh1系にする、2. CD8陽性細胞は細胞性免疫担当細胞であり、ウイルスや腫瘍細胞等の異物を効率よく排除することができる、3. CD8陽性細胞を得る場合は、従来はマグネットビーズやフローサイトメーターでCD8陽性細胞を精製していたが、本発明の方法では培養しながらCD8陽性細胞をエンリッチにすることができる、4. CD8陽性細胞比が多いことから、CTLを誘導する際の前駆細胞としての使用に適している、5. CD8陽性細胞比の少ない細胞集団からでも、CD8陽性細胞比率を高めながら培養することができる、等の利点がある。よって、本発明の方法は細胞傷害性リンパ球の調製において極めて有用である。

【0073】

なお、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球におけるCD8陽性細胞の比率は、特に限定するものではないが、例えば抗CD8抗体を使用して測定することができる。

【0074】

また、本発明の方法により調製された細胞傷害性リンパ球は培養後の細胞を長期間にわたって維持、あるいはこれを増殖させても、従来観察されたような高い細胞傷害活性が維持されているという性質を有している。すなわち、該細胞傷害性リンパ球は、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養

の少なくともいずれか1つを行なったものと比べて、細胞傷害活性が高く維持される。従って、培養された細胞傷害性リンパ球をクローン化することにより、安定した細胞傷害活性を有するリンパ球として維持することもできる。また、誘導された細胞傷害性リンパ球に抗原、各種サイトカイン、抗CD3抗体刺激を与えることにより増殖させ、拡大培養することができる。この細胞傷害性リンパ球の維持、拡大培養には、特に限定はなく、公知の方法を用いることができる。

【0075】

上記の細胞傷害性リンパ球の維持とは、細胞傷害性リンパ球を細胞傷害活性を保ったまま維持することをいう。その際の培養条件に特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を適用することができる。例えば、37℃、5%CO₂等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。使用される培地や、同時に使用されるその他の成分等は前記と同様である。

【0076】

本発明の方法における細胞傷害性リンパ球の維持および拡大培養は、本発明の有効成分、すなわちフィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地中における血清及び血漿の濃度が0～5%未満である培地中で細胞傷害性リンパ球をそれぞれ継続培養および拡大培養することを1つの大きな特徴とする。拡大培養によれば、細胞傷害性リンパ球の有する細胞傷害活性を維持させた状態でその細胞数を増加させることができる。すなわち、本発明の方法は、1つの態様として、細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法を提供する。

【0077】

本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球は所望の標的細胞を認識する能力を有しており、例えば標的となる細胞を、その細胞傷害活性により破壊する。この細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性は公知の方法により評価できる。例えば、放射性物質、蛍光物質等で標識した標的細胞に対する細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性を、細胞傷害性リンパ球により破壊された標的細胞に由来する放射活性や蛍光強度を測定することによって評価できる。また、細胞傷害性リンパ球や標的細胞より特異的に遊離されるGM-CSF、IFN- γ 等のサイトカイン量を測定することにより検出することもできる。その他蛍光色素等によって標識された抗原ペプチド-MHC複合体の使用によって直接確認することもできる。この場合、例えば細胞傷害性リンパ球を細胞傷害性リンパ球特異性抗体とカップリングさせた第1蛍光マーカ-と接触させた後に第2蛍光マーカ-とカップリングさせた抗原ペプチド-MHC複合体を接触させ、そして二重標識細胞の存在をFACS (fluorescence-activated cell sorting) 分析することにより細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性を評価することができる。

【0078】

さらに、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法の特徴として、低細胞数から培養を開始することが可能である。養子免疫療法を行うためには大量のリンパ球が必要となるが、患者から大量のリンパ球を取得することは困難である。また、通常の細胞傷害性リンパ球の拡大培養では、使用する細胞数に応じた適切な培養面積の細胞培養用器材の選択や、適切な培地量での培養が必要となる。すなわち、通常は細胞培養用器材における培養面積〔すなわち、培地に接触している器材表面部分の面積 (cm²)〕に対する細胞量 (個数) は $1 \times 10^6 \text{ cells/cm}^2$ 以上、細胞濃度は $1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 以上の高密度で培養が開始され、これ以下の細胞量条件では、拡大培養率〔拡大培養前の細胞数に対する拡大培養後の細胞数の比 (拡大培養後の細胞数/拡大培養前の細胞数)〕が非常に低くなり、大量の細胞傷害性リンパ球を得るまでに長期の培養期間を要する。よって、一般的には、例えば、小さな細胞培養用器材を用いて培養を開始した後、段階的に大きなスケールの細胞培養用器材を使用する、もしくは細胞培養用器材の数を増やして希釈操作を繰り返す等の方法により、大量のリンパ球を製造するのが現状である。このように、通常の細胞傷害性リンパ球の拡大培養では、複数の培養系を必要とする。

【0079】

本発明の方法により、少量の細胞量より開始された場合でも細胞培養用器材の大きさに関わらず、高い拡大培養率で培養を行うことができる。よって、従来のような面倒な細胞培養用器材や細胞培養液の交換、細胞培養液の希釈操作は不要となる。すなわち、本発明の方法によれば、1つの細胞培養用器材を用いた培養操作により、換言すれば、1つの培養系により、充分な細胞傷害性リンパ球の拡大培養を行なうことができる。よって、本発明の方法は、細胞培養液を希釈する工程を包含しない細胞傷害性リンパ球の製造方法である。特に、本発明の方法でLAK細胞を拡大培養する場合、大容量の細胞培養用器材にLAK細胞となり得る細胞と培地を添加し、それ以降はIL-2を添加するのみでLAK細胞の拡大培養を行うことが可能である。簡便な操作で大量のLAK細胞を得ることができる点において、本発明は非常に有用である。この際、使用する本発明の有効成分としては、より高い拡大培養率を得るという観点から、好適にはフィブロネクチンフラグメントが使用できる。このように、本発明の方法によれば、短時間に必要量の細胞傷害性リンパ球を得ることができる。

【0080】

例えば、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを、本発明の有効成分の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で低細胞数から開始する場合、培養開始時において、下記(a)および(b)から選択される条件を満たす細胞量を使用して行うことができる。

(a) 使用する細胞培養用器材における培養面積に対する細胞量の比率が、好適には $1 \text{ cell/cm}^2 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 、より好適には $10 \text{ cells/cm}^2 \sim 1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 、特に好適には $1 \times 10^2 \text{ cells/cm}^2 \sim 5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ である。

(b) 培地中の細胞の濃度が、好適には $1 \text{ cell/ml} \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 、より好適には $10 \text{ cells/ml} \sim 1 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 、特に好適には $1 \times 10^2 \text{ cells/ml} \sim 5 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ である。

なお、ここで細胞量とは、細胞傷害性リンパ球および/または前駆細胞の個数をいう。

【0081】

また、本発明の方法においては、細胞培養液の希釈操作の工程を包含しない、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを1つの培養系で行なう方法が例示される。

【0082】

さらに本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法の特徴として、高細胞数での培養を行うことが可能となる。すなわち、培養途中に細胞培養液を新鮮な培地で希釈する工程、培地を交換する工程、もしくは細胞培養用器材を交換する工程を包含する場合、これらの工程直後の培養条件を高濃度（例えば、培養液中の細胞の濃度が $2 \times 10^5 \text{ cells/ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ 、好適には $2 \times 10^5 \text{ cells/ml} \sim 5 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ 、さらに好適には $2 \times 10^5 \text{ cells/ml} \sim 2 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ ）もしくは高密度（例えば、細胞培養用器材における培養面積との比率が $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/cm}^2$ 、好適には $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 5 \times 10^7 \text{ cells/cm}^2$ 、さらに好適には $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 2 \times 10^7 \text{ cells/cm}^2$ ）に設定した場合においても、本発明の方法は従来法と比較して、良好な拡大培養率を実現することができる。通常の細胞傷害性リンパ球の拡大培養においては、培養開始時は細胞数を比較的高濃度もしくは高密度に設定されることが多いが、細胞の増殖率が上がってくると培養液の細胞濃度や培養基材中の細胞密度を低く設定される。本発明の高細胞数での培養とは、このような培養途中における細胞濃度や細胞密度の設定時において培養液中の細胞の濃度が、 $2 \times 10^5 \text{ cells/ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ 、もしくは細胞培養用器材における培養面積との比率が $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/cm}^2$ という高濃度又は高密度な条件に設定される細胞傷害性リンパ球の製造方法である。なお、ここでいう細胞培養液を新鮮な培地で希釈する工程直後、培地を交換する工程直後、もしくは細胞培養用器材を交換する工程

直後とは、培養開始時を包含するものではない。

【0083】

このような高細胞数での培養が実施できる利点としては、使用する培地、血清・血漿等の培地添加物、細胞培養用器材、労力および培養スペースの削減が挙げられる。養子免疫療法では大量のリンパ球を必要とするため、使用される培地や細胞培養用器材が非常に多く必要となり、それに伴って大規模な培養スペースや多くの人員も必要となる。これらは養子免疫療法が普及する上で大きな課題となるものである。従って、本発明の方法はこのような課題を解決することができることから施設の設営、運営上、非常に有意義な発明である。

【0084】

前述したとおり、本発明の方法は、低濃度もしくは低密度での細胞培養、高濃度もしくは高密度での細胞培養のいずれにも適用可能な方法であることから、本発明の方法を用いることにより、培養状況に応じてさまざまな細胞濃度もしくは細胞密度での細胞傷害性リンパ球の製造が可能となる。

【0085】

また、本発明の方法においては、適切なフィーダ細胞と共培養することもできる。細胞傷害性リンパ球をフィーダ細胞と共培養する場合には、細胞傷害性リンパ球、フィーダ細胞の両者の維持、生育に適した培地であることが望ましい。当該培地としては、市販の培地が使用できる。

【0086】

本発明の方法に使用されるフィーダ細胞は、抗CD3抗体と協同して細胞傷害性リンパ球を刺激し、T細胞レセプターを活性化するものであれば特に限定はない。本発明には、例えば、PBMCやエプスタイン・バーウイルスによって形質転換されたB細胞（EBV-B細胞）が使用される。通常、フィーダ細胞は放射線照射のような手段で増殖能を奪ったうえで使用される。なお、フィーダ細胞の培地中における含有量は公知の方法に従って決定すればよく、例えば、 $1 \times 10^5 \sim 7 \text{ cells/ml}$ が好適である。

【0087】

特に好ましい態様においては、フィーダ細胞として、非ウイルス感染細胞、例えば、EBV-B細胞以外のものが使用される。これにより、拡大培養された細胞傷害性リンパ球中にEBV-B細胞が混在する可能性を排除することができ、養子免疫療法のような細胞傷害性リンパ球を利用した医療の安全性を高めることが可能となる。

【0088】

また、本発明の方法においては、適切な抗原提示細胞と共培養することもできる。抗原提示細胞は、抗原提示能を有する細胞に抗原ペプチドを付加し、その表面に抗原ペプチドを提示させることにより調製することができる〔例えば、ベンドナレク M. A. ら (Bendnarek M. A., et al.)、J. Immunol.、第147巻、第12号、第4047～4053頁（1991）を参照〕。また、抗原提示能を有する細胞が抗原を処理 (process) する能力を有している場合には、当該細胞に抗原を負荷することにより、抗原が細胞内に取り込まれてプロセッシングを受け、断片化された抗原ペプチドが細胞表面に提示される。なお、抗原ペプチドを抗原提示能を有する細胞に付加する場合、使用される抗原提示細胞、誘導しようとする細胞傷害性リンパ球のMHC拘束性に合致する抗原ペプチドまたはMHC非拘束性の抗原ペプチドが使用される。

【0089】

なお、本発明において使用される抗原は特に限定されるものではなく、例えば、細菌、ウイルスなどの外来性抗原や腫瘍関連抗原（癌抗原）などの内存性抗原等が挙げられる。

【0090】

本発明においては、抗原提示細胞は非増殖性とすることが好ましい。細胞を非増殖性とするためには、例えばX線等の放射線照射またはマイトマイシン (mitomycin) 等の薬剤による処理を行えばよい。

【0091】

本発明の製造方法によりLAK細胞を製造する場合、前記有効成分の存在下、IL-2とともにLAK細胞となり得る細胞をインキュベートすることにより実施される。LAK細胞となり得る細胞としては、特に限定されるものではなく、例えば末梢血単核球(PBMC)、NK細胞、臍帯血単核球、造血幹細胞、これらの細胞を含有する血液成分等が挙げられる。

【0092】

また、LAK細胞を培養するための一般的な条件は、上記の培地を使用する点を除いては、公知の条件〔例えば、細胞工学、Vol. 14、No. 2、p223~227、(1995年)；細胞培養、17、(6)、p192~195、(1991年)；THE LANCET、Vol. 356、p802~807、(2000)；Current Protocols in Immunology, supplement 17, UNIT 7. 7を参照〕に従えばよい。培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、37℃、5%CO₂等の条件下で培養することができる。この培養は通常、2~15日程度実施される。また、適当な時間間隔で細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を行っても良い。

【0093】

上記のLAK細胞の誘導、維持、拡大培養と同様に、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に培養することにより、CTL、TILについても高い細胞傷害活性を有する細胞群を調製することができる。本発明においては、これらの細胞の活性化操作においてフィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を共存させ、かつ培地中における血清及び血漿の濃度が0~5%未満である培地を使用する他には特に限定はなく、前記細胞の培養、活性化に適した培地を使用して実施することができる。フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の使用量、添加方法等については前記方法に準じて適切なものを選択すればよい。

【0094】

なお、本発明の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法については、前記有効成分が、当該方法に使用される培養系に存在しており、さらに培地中の血清及び血漿の濃度が0~5%未満であれば特に限定は無く、上記以外の従来の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法において、その培養系に前記有効成分を存在させて、さらに培地中の血清及び血漿の濃度が0~5%未満であれば本発明に包含される。

【0095】

本発明の別の態様として、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有し、かつ培地中における血清及び血漿の濃度が0~5%未満である細胞傷害性リンパ球培養用培地が提供される。当該培地は、さらにその他の任意の成分、たとえば、公知の細胞培養に用いられる培地成分、タンパク質、サイトカイン類(好適にはIL-2)、所望のその他の成分とからなる。なお、当該培地は、本発明の有効成分、および培地中の総含有濃度が0~5%未満となるように自己又は非自己の血清や血漿を用い、公知の方法に準じて製造することができる。当該培地中の本発明の有効成分等の含有量は、本発明の所望の効果が得られれば特に限定されるものではなく、例えば、本発明の方法に使用される前記培地中の有効成分等の含有量に準じて、所望により、適宜、決定することができる。本発明の培地の一態様としては、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固定化された細胞培養用担体を含有する培地、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固定化された細胞培養用器材に封入して提供される培地が包含される。

【0096】

上記の細胞傷害性リンパ球の製造方法を用いて得られたリンパ球含有培養物中には、通常、ヘルパーT細胞等の細胞傷害性リンパ球以外の細胞も混在している。しかしながら、本発明により得られたリンパ球含有培養物中には細胞傷害活性を保持するリンパ球が多く含まれているため、該培養物から遠心分離等により該培養物中の細胞を回収し、本発明の

方法により得られた細胞傷害性リンパ球としてそのまま使用することができる。しかも、前記有効成分等を細胞培養用器材等に固定化しておけば、得られた細胞傷害性リンパ球における該成分等の混入の心配はない。

【0097】

また、さらに該培養物から公知の方法により、細胞傷害性リンパ球を高含有する細胞集団（あるいは培養物）を分離し、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球として使用することもできる。すなわち、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法は、当該方法により得られた培養物から細胞傷害性リンパ球を高含有する細胞集団を選択する工程を含むことができる。

【0098】

細胞傷害性リンパ球を高含有する該細胞集団の選択方法については特に限定はないが、例えば培養物から所望の細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD8抗体を結合させた細胞培養用器材もしくは担体を用いて目的の細胞のみを選択的に回収する方法や、フローサイトメーターを用いる方法が挙げられる。前記担体としては磁気ビーズやカラムが例示される。また、培養物から所望の細胞以外の細胞を吸着除去することにより、目的の細胞を高含有する細胞集団を得ることもできる。例えば、ヘルパーT細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD4抗体を使用し、当該リンパ球培養物からヘルパーT細胞を除去することができる。この工程にはフローサイトメーターを用いることもできる。

【0099】

さらに本発明は、上記の本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法で得られた、細胞傷害性リンパ球を提供する。当該リンパ球、高い細胞傷害活性を有しており、長期間にわたる継続培養や拡大培養を行っても細胞傷害活性の低下が少ないという性質を有する。また、本発明は、当該リンパ球を有効成分として含有する医薬（治療剤）を提供する。特に、当該リンパ球を含有する前記治療剤は養子免疫療法への使用に適している。養子免疫療法においては、患者の治療に適した細胞傷害活性を有するリンパ球が、例えば静脈への投与によって患者に投与される。当該治療剤は製薬分野で公知の方法に従い、例えば、本発明の方法により調製された当該リンパ球を有効成分として、たとえば、公知の非経口投与に適した有機または無機の担体、賦形剤、安定剤等と混合することにより調製できる。なお、治療剤における本発明のリンパ球の含有量、治療剤の投与量、当該治療剤に関する諸条件は公知の養子免疫療法に従って適宜、決定できる。

【0100】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法においては、当該リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに包含することができる。すなわち、本発明は、その一態様として、細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む細胞傷害性リンパ球の製造方法を提供する。なお、「外来」とは、遺伝子導入対象のリンパ球に対して外来であることをいう。

【0101】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法、特に細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法を行うことにより、培養されるリンパ球のDNA複製能が増強される。よって、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法に、遺伝子の導入工程を包含することにより、遺伝子の導入効率の向上が期待される。

【0102】

外来遺伝子の導入手段には特に限定はなく、公知の遺伝子導入方法により適切なものを選択して使用することができる。遺伝子導入の工程は、細胞傷害性リンパ球の製造の際、任意の時点で実施することができる。例えば、前記リンパ球の誘導、維持および／または拡大培養のいずれかの工程と同時に、あるいは該工程の後に実施するのが、作業効率の観点から好適である。

【0103】

前記の遺伝子導入方法としては、ウイルスベクターを使用する方法、該ベクターを使用

しない方法のいずれもが本発明に使用できる。それらの方法の詳細についてはすでに多くの文献が公表されている。

【0104】

前記ウイルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使用される公知のウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクター等が使用される。特に好適には、ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスが使用される。上記ウイルスベクターとしては、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。

【0105】

レトロウイルスベクターは、当該ベクターが導入される細胞の染色体DNA中に該ベクターに挿入されている外来遺伝子を安定に組み込むことができ、遺伝子治療等の目的に使用されている。当該ベクターは分裂、増殖中の細胞に対する感染効率が高いことから、本発明における、細胞傷害性リンパ球の製造工程、例えば、拡大培養の工程において遺伝子導入を行なうのに好適である。

【0106】

ウイルスベクターを使用しない遺伝子導入方法としては、本発明を限定するものではないが、例えば、リボソーム、リガンドーポリリジンなどの担体を使用する方法やリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などを使用することができる。この場合にはプラスミドDNAや直鎖状DNAに組み込まれた外来遺伝子が導入される。

【0107】

本発明において細胞傷害性リンパ球に導入される外来遺伝子には特に限定はなく、前記細胞に導入することが望まれる任意の遺伝子を選ぶことができる。このような遺伝子としては、例えば、タンパク質（例えば、酵素、サイトカイン類、レセプター類等）をコードするものの他、アンチセンス核酸やリボザイムをコードするものが使用できる。また、遺伝子導入された細胞の選択を可能にする適当なマーカー遺伝子を同時に導入してもよい。

【0108】

前記の外来遺伝子は、例えば、適当なプロモーターの制御下に発現されるようにベクターやプラスミド等に挿入して使用することができる。また、効率のよい遺伝子の転写を達成するために、プロモーターや転写開始部位と協同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列やターミネーター配列がベクター内に存在していてもよい。また、外来遺伝子を相同組換えにより導入対象のリンパ球の染色体へ挿入することを目的として、例えば、該染色体における該遺伝子の所望の標的挿入部位の両側にある塩基配列に各々相同性を有する塩基配列からなるフランキング配列の間に外来遺伝子を配置させてもよい。導入される外来遺伝子は天然のものでも、または人工的に作製されたものでもよく、あるいは起源を異にするDNA分子がライゲーション等の公知の手段によって結合されたものであってもよい。さらに、その目的に応じて天然の配列に変異が導入された配列を有するものであってもよい。

【0109】

本発明の方法によれば、例えば、がん等の患者の治療に使用される薬剤に対する耐性に関連する酵素をコードする遺伝子を細胞傷害性リンパ球に導入して該リンパ球に薬剤耐性を付与することができる。そのような細胞傷害性リンパ球を用いれば、養子免疫療法と薬剤療法とを組み合わせることができ、従って、より高い治療効果を得ることが可能となる。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、多剤耐性遺伝子 (multidrug resistance gene) が例示される。

【0110】

一方、前記の態様とは逆に、特定の薬剤に対する感受性を付与するような遺伝子を細胞傷害性リンパ球に導入して、該薬剤に対する感受性を付与することもできる。かかる場合

、生体に移植した後のリンパ球を当該薬剤の投与によって除去することが可能となる。薬剤に対する感受性を付与する遺伝子としては、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子が例示される。

【実施例】

【0111】

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。

【0112】

製造例1 フィブロネクチンフラグメントの調製

(1) フィブロネクチンフラグメントの調製

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント H-271は、*Escherichia coli* HB101/pHD101 (FERM BP-2264) より、米国特許第5, 198, 423号明細書に記載の方法により調製した。

また、ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント H-296、CH-271、CH-296はそれぞれ、*Escherichia coli* HB101/pHD102 (FERM BP-7420)、*Escherichia coli* HB101/pCH101 (FERM BP-2799)、*Escherichia coli* HB101/pCH102 (FERM BP-2800) を用い、これを上記の明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント C-274は、*Escherichia coli* JM109/pTF7221 (FERM BP-1915) を用い、これを米国特許第5, 102, 988号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント C-CS1は、*Escherichia coli* HB101/pCS25 (FERM BP-5723) を用い、日本特許3104178号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-89、CHV-179は、それぞれ *Escherichia coli* HB101/pCHV89 (FERM P-12182)、*Escherichia coli* HB101/pCHV179 (FERM P-12183) を用い、日本特許2729712号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

また、ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-90は日本特許2729712号明細書に記載の方法で調製した。すなわち、当該明細書に記載の操作によってプラスミドpCHV90を構築したうえ、該プラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物よりCHV-90を調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-181は、国際公開第97/18318号パンフレットに記載の方法で、CHV-181をコードするDNAを含有するプラスミド(pCHV181)を構築した後、該プラスミドを導入された大腸菌(*Escherichia coli* HB101/pCHV181)を培養し、該培養物より、上記のCHV-179と同様の方法で調製した。

【0113】

(2) CHV-92の調製

上記のポリペプチドCHV-181を発現させるためのプラスミド pCHV181について、CHV-181をコードする領域中のIII-13領域をコードする領域を欠失したプラスミドCHV92を構築した。欠失操作は日本特許2729712号明細書に記載の、プラスミドpCHV179からのIII-14コード領域の欠失操作に準じて行った。

上記のプラスミドpCHV92で形質転換された大腸菌HB101(*Escherichia coli* HB101/pCHV92)を培養し、該培養物より日本特許第2729712号明細書に記載のCHV-89ポリペプチドの精製方法に準じて精製操作を行い、精製CHV-92標品を得た。

【0114】

(3) H-275-Cysの調製

ポリペプチドH-275-Cysを発現させるためのプラスミドは以下に示す操作に従って構築した。Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800) よりプラスミドpCH102を調製した。このプラスミドを鋳型とし、配列表の配列番号20に塩基配列を示すプライマー12Sと配列表の配列番号21に塩基配列を示すプライマー14Aとを用いたPCRを行い、フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインをコードする約0.8 kbのDNA断片を得た。得られたDNA断片をNcoI、BamHI (ともにタカラバイオ社製) で消化した後、NcoI、BamHIで消化したpTV118N (タカラバイオ社製) とライゲーションすることにより、プラスミドpRH1を構築した。

【0115】

プラスミドベクターpIN111-ompA₁ [グーライエブ J. ら (Ghrayeb J., et al.), EMBO J., 第3巻、第10号、第2437~2442頁 (1984)] をBamHIとHincII (タカラバイオ社製) とで消化し、リボプロテインターミネーター領域を含む約0.9 kbのDNA断片を回収した。これをBamHIとHincIIで消化した上記のプラスミドpRH1と混合してライゲーションを行い、lacプロモーター、ヘパリン結合ドメインをコードするDNA断片およびリボプロテインターミネーターをこの順に含むプラスミドpRH1-Tを得た。

【0116】

このプラスミドpRH1-Tを鋳型とし、配列表の配列番号22に塩基配列を示すプライマーCys-Aと配列表の配列番号23に塩基配列を示すプライマーCys-Sとを用いたPCR反応の後、回収した増幅DNA断片をNotI (タカラバイオ社製) で消化し、さらに該DNA断片をセルフライゲーションさせた。こうして得られた環状DNAをSpeIとScaI (タカラバイオ社製) とで消化して得られる2.3 kbのDNA断片と、プラスミドpRH1-TをSpeIとScaI (タカラバイオ社製) とで消化して得られる2.5 kbのDNA断片とを混合してライゲーションを行い、プラスミドpRH-Cysを得た。該プラスミドには、前記のH-271のN末端側にMet-Ala-Ala-Serの4アミノ酸が付加され、さらにC末端にCysが付加されたポリペプチドH-275-Cysがコードされている。

【0117】

ポリペプチドH-275-Cysは以下の方法により調製した。上記のプラスミドpRH-Cysで形質転換された大腸菌HB101 (Escherichia coli HB101/pRH-Cys) を120mlのLB培地中、37℃で1晩培養した。培養液より回収した菌体を40mlの破碎用緩衝液 (50mM Tris-HCl、1mM EDTA、150mM NaCl、1mM DTT、1mM PMSF、pH7.5) に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破碎した。遠心分離を行って得られた上清を精製用緩衝液 (50mM Tris-HCl、pH7.5) で平衡化されたハイトラップヘパリンカラム (ファルマシア社製) にかけた。同緩衝液でカラム内の非吸着画分を洗浄した後、0~1M NaCl濃度勾配を持つ精製用緩衝液で溶出を行った。溶出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、H-275-Cysの分子量に相当する画分を集めて精製H-275-Cys標品を得た。

【0118】

実施例1 低血清培地を用いたLAK細胞 (Lymphokine-activated killer cells) 培養系における拡大培養率の測定

(1) PBMCの分離および保存

インフォームド・コンセントの得られたヒト健常人ドナーより成分採血を実施後、採血液をPBS (-) で2倍希釈し、Ficoll-paque (ファルマシア社製) 上に重層して500×gで20分間遠心分離した。中間層の末梢血単核細胞 (PBMC) をピペットで回収、洗浄した。採取したPBMCは90% FBS (Bio Whittake

r社製) / 10% DMSO (SIGMA社製) からなる保存液に懸濁し、液体窒素中にて保存した。LAK誘導時にはこれら保存PBMCを37℃水浴中にて急速融解し、10 μ g/ml DNase (Calbiochem社製) を含むRPMI 1640培地 (Bio Whittaker社製) で洗浄後、トリパンブルー染色法にて生細胞数を算出して各実験に供した。

【0119】

(2) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材 (容器) に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち24穴細胞培養プレートまたは12.5 cm² 細胞培養フラスコ (Falcon社製) に抗ヒトCD3抗体 (ヤンセン協和社製) (終濃度5 μ g/ml) を含むPBSを1ml (24穴プレートの場合) または2ml (12.5 cm² フラスコの場合) ずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載の各フィブロネクチンフラグメント (FNfr) を終濃度10 μ g/ml (24穴プレートの場合) または25 μ g/ml (12.5 cm² フラスコの場合) となるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、XVIVO20培地 (Bio whittaker社製) で1回洗浄し各実験に供した。

【0120】

(3) LAK細胞の誘導および培養

1% Human AB血清を含むXVIVO20 (以下1% XVIVO20と略す) に1 $\times 10^6$ cells/mlとなるように実施例1-(1) で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2) で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1ml/ウェルずつまき、終濃度1000 U/mlとなるようにIL-2 (塩野義製薬社製) を添加した。これらのプレートを5% CO₂ 中37℃で培養した (培養0日目)。培養開始後2日目、3日目には1000 U/mlのIL-2を含む1% XVIVO20を1ml/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜1% XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500 U/mlとなるようIL-2を添加した。培養を継続し、2~3日毎に培養開始5日目と同様に適宜1% XVIVO20を用いて希釈し終濃度300~500 U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始後11日目または15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表1に示す。

【0121】

【表1】

表1

血清濃度 (%)	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率
1	11日間	対照 (FNfr非固定化)	$\times 252$
1	11日間	CH-296	$\times 670$
1	11日間	H-296	$\times 615.6$
1	15日間	対照 (FNfr非固定化)	$\times 403.2$
1	15日間	CH-296	$\times 588$
1	15日間	H-296	$\times 708$

【0122】

表1に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群と比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らか

となった。

【0123】

実施例2 低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）

（1）LAK細胞の誘導および培養

0.5%または1%XVIVO20に 1×10^6 cells/mlとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1ml/ウェルずつまき、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2（塩野義製薬社製）を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目、3日目には1000U/mlのIL-2を含む0.5%または1%XVIVO20を1ml/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜0.5%または1%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始9日目には実施例1-(2)と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコ（ただし、固定化に用いる抗ヒトCD3抗体の濃度は0.5μg/mlとした）に適宜0.5%または1%XVIVO20を用いて希釈した培養液を移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始12日目に再度適宜0.5%または1%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表2に示す。

【0124】

【表2】

表2

血清濃度 (%)	フィブロネクチンフラグメント	培養開始0日目刺激	培養開始9日目刺激	拡大培養率 (倍率)
0.5	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×13
0.5	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×88
0.5	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×410
1	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×403
1	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×1624
1	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	×588
1	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×3560
1	H-296	抗CD3+H-296	なし	×708
1	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	×3000

【0125】

表2に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0126】

実施例3 低血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター（IL-2R）発現の誘導

（1）LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0127】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(1)で調製した 2×10^5 cellsのLAK細胞を1%パラホルムアルデヒド(ナカライテスク社製)を含むPBS(ニッスイ社製)を用いて固定した後、PBSで洗浄した。固定細胞を1%BSA(SIGMA社製)を含む $100 \mu\text{l}$ のPBS中に懸濁し、FITC標識マウスIgG1もしくはFITC標識マウス抗ヒトIL-2R(CD25)抗体(ともにDAKO社製)を添加後、氷上で30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をPBSで洗浄し、再度1%パラホルムアルデヒドを含むPBSに懸濁した。この細胞をFACS Vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表3に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

【0128】

【表3】

表3

血清濃度 (%)	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	IL-2R発現率 (%)
0.5	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	3.48
0.5	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	43.22
0.5	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	81.11
0.5	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	71.49
1	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	8.02
1	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	42.8
1	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	5.91
1	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	77.94
1	H-296	抗CD3+H-296	なし	8.94
1	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	70.29

【0129】

表3に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0130】

実施例4 低血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0131】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(1)で調製した 2×10^5 cellsのLAK細胞を1%パラホルムアルデヒド(ナカライテスク社製)を含むPBS(ニッスイ社製)を用いて固定した後、PBSで洗浄した。固定細胞を1%BSA(SIGMA社製)を含む $100 \mu\text{l}$ のPBS中に懸濁し、FITC標識マウスIgG1もしくはFITC標識マウス抗ヒトCD8抗体(ともにDAKO社製)を添加後、氷上で30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をPBSで洗浄し、再度1%パラホルムアルデヒドを含むPBSに懸濁した。この細胞をFACS Vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、CD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表4に示す。

【0132】

【表4】

表4

血清濃度 (%)	フィブロネクチンフラグメント	培養開始0日目刺激	培養開始9日目刺激	CD8陽性細胞含有率 (%)
0.5	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	26.95
0.5	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	44.67
1	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	53.26
1	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	35.56
1	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	61.29
1	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	62.58

【0133】

表4に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期または初期中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0134】

実施例5 無血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

血清を含まないXVIVO20（以下0%XVIVO20と略す）に 1×10^6 cells/mlとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1ml/ウェルずつまき、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2（塩野義製薬社製）を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目、3日目には1000U/mlのIL-2を含む0%XVIVO20を1ml/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養を継続し、2～3日毎に培養開始5日目と同様に適宜0%XVIVO20を用いて希釈し終濃度300～500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始後11日目または15日目にトリパンプルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表5に示す。

【0135】

【表5】

表5

血清濃度 (%)	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率 (倍率)
0	11日間	対照 (FNfr非固定化)	36
0	11日間	CH-296	103.7
0	15日間	対照 (FNfr非固定化)	76.3
0	15日間	CH-296	134.6
0	15日間	対照 (FNfr非固定化)	28.8
0	15日間	H-296	46.8

【0136】

表5に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清

を含まない培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0137】

実施例6 無血清培地でのLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）

（1）LAK細胞の誘導および培養

0%XVIVO20に 1×10^6 cells/mlとなるように実施例1-（1）で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-（2）で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1ml/ウェルずつまき、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2（塩野義製薬社製）を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目、3日目には1000U/mlのIL-2を含む0%XVIVO20を1ml/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始9日目には実施例1-（2）と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコ（ただし、固定化に用いる抗ヒトCD3抗体の濃度は0.5μg/mlとした）に適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始12日目に再度適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表6に示す。

【0138】

【表6】

血清濃度 (%)	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始9日目 刺激	拡大培養率 (倍率)
0	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×2.9
0	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×3.6
0	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	×5.6
0	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×19.9
0	H-296	抗CD3+H-296	なし	×4.7
0	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	×20.9

【0139】

表6に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、血清を含まない培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0140】

実施例7 無血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2R発現の誘導

（1）LAK細胞の誘導および培養

実施例6-（1）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0141】

（2）LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-（2）と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。

結果を表7に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現

率(%)と表示する。

【0142】

【表7】

表7

血清濃度 (%)	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	IL-2R発現率 (%)
0	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	1.7
0	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	50.5
0	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	3.0
0	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	82.2
0	H-296	抗CD3+H-296	なし	3.2
0	H-296	抗CD+H-296	抗CD3+H-296	91.9

【0143】

表7に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0144】

実施例8 無血清培地(AIMV)を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例5-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないAIMV培地(インビトロジェン社製、以下0%AIMVと略す)に変更した。結果を表8に示す。

【0145】

【表8】

表8

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
0%AIMV	12日間	対照(FNfr非固定化)	×21
0%AIMV	12日間	CH-296	×110
0%AIMV	15日間	対照(FNfr非固定化)	×44
0%AIMV	15日間	CH-296	×498
0%AIMV	12日間	対照(FNfr非固定化)	×0
0%AIMV	12日間	H-296	×33
0%AIMV	15日間	対照(FNfr非固定化)	×0
0%AIMV	15日間	H-296	×245

【0146】

表8に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。またこの効果は無血清培養用の基本培地を変えても発揮される。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を含まない培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0147】

実施例9 無血清培地でのLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(低細胞数からのLAK細胞誘導・培養/希釈操作なしでの培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

XVIVO20(血清を含まない)に 1×10^5 cells/mlとなるように実施例

出証特2004-3085985

1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2)と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化6ウェルプレートに1ml/ウェルずつまき、XVIVO20(血清を含まない) 4mlを加え(1×10^4 cells/cm²)、さらに終濃度500U/mlとなるようにIL-2(塩野義製薬社製)を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後2日目、3日目、4日目には終濃度500U/mlとなるようにIL-2を添加した。培養を継続し、培養開始後7日目以降2~3日毎に終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。この間培養液の希釈操作は全く行わなかった。

培養開始後15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率を算出した。結果を表9に示す。

【0148】

【表9】

培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
15日間	対照(FNfr非固定化)	増殖しないため測定不可能
15日間	CH-296	×64.3

【0149】

表9に示されるように、低細胞数からのLAK細胞誘導時に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、誘導途中の細胞の希釈操作を必要とすることなしに培養開始後15日目に高い拡大培養率が得られた。これに対して対照群では培養開始15日目でもほとんど増殖しなかった。すなわち無血清培地を用いて低細胞数からLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、全く希釈操作を必要とすることなく、高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0150】

実施例10 無血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2R発現の誘導(低細胞数からのLAK細胞誘導・培養/希釈操作なしでの培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例9-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0151】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表10に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

【0152】

【表10】

培養日数	フィブロネクチンフラグメント	IL-2R発現率(%)
15日間	対照(FNfr非固定化)	増殖しないため測定不可能
15日間	CH-296	98.0

【0153】

表10に示されるように、低細胞数からのLAK細胞誘導時に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、誘導途中の細胞の希釈操作を必要とすることなしに培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち無血清培地を用いて低細胞数からLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、全く希釈操作を必要とすることなく、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0154】

実施例 11 無血清培地 (AIMV) を用いて培養した LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 8-(1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。

【0155】

(2) LAK 細胞における CD8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4-(2) と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 11 に示す。

【0156】

【表 11】

表 11

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	CD8 陽性細胞含有率 (%)
0% AIMV	対照 (FNfr 非固定化)	24.7
0% AIMV	CH-296	45.8
0% AIMV	H-296	62.6

【0157】

表 11 に示されるように、血清を含まない培地を用いての LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中の LAK 細胞中における CD8 陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いて LAK 細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK 細胞中の CD8 陽性細胞の含有率を高くしながら LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0158】

実施例 12 低血清培地 (AIMV) を用いた LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 1-(3) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を 1% または 5% Human AB 血清を含む AIMV 培地 (インビトロジェン社製、以下 1% AIMV または 5% AIMV と略す) に変更した。結果を表 12 に示す。

【0159】

【表 12】

表 12

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率 (倍率)
1% AIMV	11 日間	対照 (FNfr 非固定化)	×7
1% AIMV	11 日間	CH-296	×156
1% AIMV	11 日間	H-296	×39
1% AIMV	15 日間	対照 (FNfr 非固定化)	×3
1% AIMV	15 日間	CH-296	×651
1% AIMV	15 日間	H-296	×305
5% AIMV	11 日間	対照 (FNfr 非固定化)	×454
5% AIMV	11 日間	CH-296	×1087
5% AIMV	11 日間	H-296	×727
5% AIMV	15 日間	対照 (FNfr 非固定化)	×778
5% AIMV	15 日間	CH-296	×1548
5% AIMV	15 日間	H-296	×882

【0160】

表 12 に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地 (AIMV) を用いての LAK 細胞

胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだAIMV培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0161】

実施例13 種々の低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の効果

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を1% Human AB血清を含むXVIVO20培地・XVIVO10培地またはAIMV培地(以下それぞれ1%XVIVO20・1%XVIVO10または1%AIMVと略す)に変更し、各培地における拡大培養率を測定した。結果を表13に示す。

【0162】

【表13】

表13

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
1%XVIVO20	11日間	対照(FNfr非固定化)	×49
1%XVIVO20	11日間	CH-296	×153
1%AIMV	11日間	対照(FNfr非固定化)	×79
1%AIMV	11日間	CH-296	×832
1%XVIVO20	15日間	対照(FNfr非固定化)	×272
1%XVIVO20	15日間	CH-296	×513
1%XVIVO10	15日間	対照(FNfr非固定化)	×113
1%XVIVO10	15日間	CH-296	×162
1%AIMV	15日間	対照(FNfr非固定化)	×744
1%AIMV	15日間	CH-296	×8928

【0163】

表13に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。またこの効果は基本培地を変えても発揮される。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだいずれの培地を用いたLAK細胞培養時にも好適に使用されることが明らかとなった。

【0164】

実施例14 低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を0.2% Human AB血清を含むXVIVO20培地に変更した。結果を表14に示す。

【0165】

【表14】

表14

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
0.2%XVIVO20	15日間	対照(FNfr非固定化)	×11
0.2%XVIVO20	15日間	CH-296	×67

【0166】

表14に示されるように、低濃度(0.2%)の血清を含んだ培地(XVIVO20)を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことか

ら各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0167】

実施例15 低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）

（1）LAK細胞の誘導および培養

実施例2-（1）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2% Human AB血清を含むXVIVO20培地または1% Human AB血清を含むXVIVO10に変更した。結果を表15に示す。

【0168】

【表15】

表15

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	培養開始0日目刺激	培養開始9日目刺激	拡大培養率(倍率)
0.2%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×11
0.2%XVIVO20	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×9
0.2%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×86
1%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×113
1%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×281
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×1282
1%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×24
1%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×367
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×1030
1%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	×1001

【0169】

表15に示されるように、低濃度の血清（0.2%）を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。またこの効果は基本培地を変えても発揮される。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0170】

実施例16 低血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター（IL-2R）発現の誘導

（1）LAK細胞の誘導および培養

実施例2-（1）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2% Human AB血清を含むXVIVO20培地または1% Human AB血清を含むXVIVO10に変更した。

【0171】

（2）LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-（2）と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表16に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率（%）をIL-2R発現率（%）と表示する。

【0172】

【表16】

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	I L - 2 R 発 現率 (%)
0.2%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	3.01
0.2%XVIVO20	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	59.08
0.2%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	77.88
1%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	13.77
1%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	58.28
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	91.11

【0173】

表16に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるI L - 2 R発現率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えても発揮される。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、I L - 2 R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0174】

実施例17 低血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2%もしくは1%Human AB血清を含むXVIVO20培地または1%Human AB血清を含むXVIVO10に変更した。

【0175】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表17に示す。

【0176】

【表17】

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率 (%)
0.2%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	50.9
0.2%XVIVO20	CH-296	70.9
1%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	36.2
1%XVIVO20	CH-296	53.6
1%XVIVO20	H-296	50.6
1%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	19.9
1%XVIVO10	CH-296	45.5
1%XVIVO10	H-296	53.6

【0177】

表17に示されるように、低血清を含む培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。すなわち低濃度の血清を含む培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0178】

実施例 18 低血清培地を用いた LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率（繰返し刺激による拡大培養）

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 2-(1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を 0.2% Human AB 血清を含む XVIVO20 培地または 1% Human AB 血清を含む XVIVO10 に変更した。

【0179】

(2) LAK 細胞における CD8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4-(2) と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 18 に示す。

【0180】

【表 18】

表 18

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	CD8 陽性細胞含 有率 (%)
0.2%XVIVO20	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	抗 CD3	38.9
0.2%XVIVO20	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	44.5
1%XVIVO10	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	抗 CD3	25.6
1%XVIVO10	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	38.3

【0181】

表 18 に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いての LAK 細胞誘導初期または中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中の LAK 細胞中における CD8 陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いて LAK 細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK 細胞中の CD8 陽性細胞の含有率を高くしながら LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0182】

実施例 19 無血清培地を用いた LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 5-(1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まない XVIVO10 培地または AIMV 培地に変更した。結果を表 19 に示す。

【0183】

【表 19】

表 19

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率 (倍率)
0%XVIVO10	11日間	対照 (FNfr非固定化)	×32
0%XVIVO10	11日間	CH-296	×95
0%XVIVO10	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×205
0%XVIVO10	15日間	CH-296	×407
0%XVIVO10	11日間	対照 (FNfr非固定化)	×29
0%XVIVO10	11日間	H-296	×78
0%XVIVO10	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×27
0%XVIVO10	15日間	H-296	×194
0%AIMV	11日間	対照 (FNfr非固定化)	×25
0%AIMV	11日間	CH-296	×85
0%AIMV	11日間	H-296	×69
0%AIMV	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×61
0%AIMV	15日間	CH-296	×202
0%AIMV	15日間	H-296	×392

【0184】

表 19 に示されるように、血清を含まない培地を用いての LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して LAK 細胞の拡大培養率が高い。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を含まない培地を用いた LAK 細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0185】

実施例 20 無血清培地での LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定 (繰り返し刺激による拡大培養)

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 6 - (1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まない XVIVO10 培地に変更した。結果を表 20 に示す。

【0186】

【表 20】

表 20

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	拡大培養率 (倍率)
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗 CD3	なし	×27
0%XVIVO10	FNfr非固定化	抗 CD3	抗 CD3	×288
0%XVIVO10	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	×845
0%XVIVO10	H-296	抗 CD3+H-296	抗 CD3+H-296	×893

【0187】

表 20 に示されるように、血清を含まない培地を用いての LAK 細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗 CD3 抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して LAK 細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK 細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗 CD3 抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。すなわち LAK 細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗 CD3 抗体を用いて刺激することにより、血清を含まない培地を用いた場合でも高い拡大培養率で LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0188】

実施例 21 無血清培地を用いた LAK 細胞培養系における IL-2 R 発現の誘導

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 6-(1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まない XVIVO10 培地に変更した。

【0189】

(2) LAK 細胞における IL-2 R 発現率の測定

実施例 3-(2) と同様の方法で、IL-2 R 発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表 21 に示す。かかる表では IL-2 R 発現陽性細胞含有率 (%) を IL-2 R 発現率 (%) と表示する。

【0190】

【表 21】

表 21

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	IL-2 R 発 現率 (%)
0%XVIVO10	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	なし	24.99
0%XVIVO10	FNfr 非固定化	抗 CD3	抗 CD3	80.58
0%XVIVO10	CH-296	抗 CD3+CH-296	なし	40.17
0%XVIVO10	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	92.59
0%XVIVO10	H-296	抗 CD3+H-296	なし	30.09
0%XVIVO10	H-296	抗 CD3+H-296	抗 CD3+H-296	87.15

【0191】

表 21 に示されるように、血清を含まない培地を用いての LAK 細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中の LAK 細胞表面上における IL-2 R 発現率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いて LAK 細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2 R 発現率を高くしながら LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0192】

実施例 22 無血清培地を用いて培養した LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 5-(1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まない XVIVO20 または XVIVO10 または AIMV 培地に変更した。

【0193】

(2) LAK 細胞における CD8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4-(2) と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 22 に示す。

【0194】

【表22】

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率 (%)
0%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	20.01
0%XVIVO20	CH-296	64.48
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	27.91
0%XVIVO10	CH-296	47.72
0%AIMV	対照 (FNfr非固定化)	21.14
0%AIMV	CH-296	58.8
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	16.53
0%XVIVO10	CH-296	35.22
0%XVIVO10	H-296	27.29

【0195】

表22に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0196】

実施例23 無血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率（繰り返し刺激による拡大培養）

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例6-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないXVIVO20またはXVIVO10培地に変更した。

【0197】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表23に示す。

【0198】

【表23】

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	培養開始0日目刺激	培養開始9日目刺激	CD8陽性細胞含有率 (%)
0%XVIVO20	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	20.01
0%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	64.48
0%XVIVO20	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	0.29
0%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	35.21
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	27.91
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	47.72
0%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	37.97
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	50.22
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	16.53
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	35.22
0%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	なし	27.29
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	75.33
0%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	61.08

【0199】

表23に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期または初期中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0200】

実施例24 低血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2R発現の誘導（低細胞数からのLAK細胞誘導・培養／希釈操作なしでの培養）

(1) LAK細胞の誘導および培養

(1) LAK細胞の誘導および培養

1%ヒトAB血清を含むXVIVO20（以下1%XVIVO20と省略）に 1×10^5 cells/mlまたは 5×10^4 cells/mlとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2)と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化6ウェルプレートに1ml/ウェルずつまき、1%XVIVO20 4mlを加え（ 1×10^4 cells/cm²または 5×10^3 cells/cm²）、さらに終濃度500U/mlとなるようにIL-2（塩野義製薬社製）を添加した。これらのプレートを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目、3日目、4日目には終濃度500U/mlとなるようにIL-2を添加した。培養を継続し、培養開始後7日目以降2～3日毎に終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。この間培養液の希釈操作は全く行わなかった。培養開始後16日目に細胞を回収した。

【0201】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。結果を表24に示す。

【0202】

【表24】

表24

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	IL-2R発現率(%)
1%XVIVO20	対照(FNfr非固定化)	12.15
	CH-296	97.47
	H-296	95.43

【0203】

表24に示されるように、低細胞数からのLAK細胞誘導時に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、誘導途中の細胞の希釈操作を必要とすることなしに培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低血清培地を用いて低細胞数からLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、全く希釈操作を必要とすることなく、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0204】

実施例25 無血清・低血清培地を用いたLAK細胞培養系における細胞傷害活性の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0%から5%HumanAB血清を含むXVIVO20または0%から5%HumanA

B血清を含むAIMV培地または5%HumanAB血清を含むXVIVO10培地に変更した。

【0205】

(2) 培養したLAK細胞の細胞傷害活性の測定

実施例25-(1)で調製した培養後15日目のLAKの細胞傷害活性は、Calcein-AMを用いた細胞傷害活性測定法〔リヒテンフェルズ R. ら (Lichtenfels R., et al.), J. Immunol. Methods, 第172巻、第2号、第227~239頁(1994)〕にて評価した。細胞株 K562、Daudi、624melを 1×10^6 cells/mlとなるよう5%FBS (Bio Whittaker社製)を含むRPMI1640培地に懸濁後、終濃度 $25 \mu\text{M}$ となるようにCalcein-AM (ドータイト社製)を添加し、 37°C で1時間培養した。細胞をCalcein-AMを含まない培地にて洗浄後、Calcein標識標的細胞とした。

実施例25-(1)で調製したLAK細胞をエフェクター細胞として $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells/mlとなるように5%ヒト血清を含むRPMI (以下5HRPMIと省略)で段階希釈後、96穴細胞培養プレートの各ウェルに $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ分注しておき、これらに 1×10^5 cells/mlに調製したCalcein標識標的細胞を $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ添加した。上記細胞懸濁液の入ったプレートを $400 \times g$ で1分間遠心後、 37°C の湿式 CO_2 インキュベーター内で4時間インキュベートした。4時間後、各ウェルから培養上清 $100 \mu\text{l}$ を採取し、蛍光プレートリーダー ($485 \text{ nm} / 538 \text{ nm}$) によって培養上清中に放出されたcalcein量 (蛍光強度) を測定した。CTLの細胞傷害活性は以下の式1にしたがって算出した。

【0206】

式1:

細胞傷害活性 (%) = $\left[\frac{(\text{各ウェルの測定値} - \text{最小放出量})}{(\text{最大放出量} - \text{最小放出量})} \right] \times 100$

【0207】

上式において最小放出量は標的細胞のみ含有するウェルのcalcein放出量であり、標的細胞からのcalcein自然放出量を示す。また、最大放出量は標的細胞に界面活性剤であるTriton X-100 (ナカライテスク社製)を終濃度0.05%となるように加えて細胞を完全破壊した際のcalcein放出量を示している。結果を表25に示す。

【0208】

【表 25】

表 25

血清濃度 ・培地	フィブロネクチン フラグメント	E/T	細胞傷害活性 (%) (標的細胞 K562)	細胞傷害活性 (%) (標的細胞 Daudi)
0%XVIVO20	対照 (FNfr 非固定化)	20	28.7	13.3
0%XVIVO20	CH-296	20	46.7	23.8
0%XVIVO20	H-296	20	49.9	19.0
0.2%XVIVO20	対照 (FNfr 非固定化)	10	13.3	11.6
0.2%XVIVO20	CH-296	10	18.2	18.6
1%XVIVO20	対照 (FNfr 非固定化)	20	36.5	24.8
1%XVIVO20	H-296	20	62.8	39
5%XVIVO20	対照 (FNfr 非固定化)	30	57.0	56.6
5%XVIVO20	CH-296	30	78.1	59.1
0%AIMV	対照 (FNfr 非固定化)	30	25.2	23.4
0%AIMV	CH-296	30	36.8	28.1
5%AIMV	対照 (FNfr 非固定化)	30	55.3	49.8
5%AIMV	CH-296	30	77.2	53.6
5%AIMV	対照 (FNfr 非固定化)	10	35.1	50.5
5%AIMV	CH-296	10	71.6	51.8
5%AIMV	H-296	10	73.9	57.8
5%XVIVO10	対照 (FNfr 非固定化)	10	72.6	51.1
5%XVIVO10	CH-296	10	84.6	57.4
5%XVIVO10	H-296	10	89.3	69.5

【0209】

表 25 に示されるように、血清を含まない培地もしくは低濃度の血清を含んだ培地を用いての LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して LAK 細胞の細胞傷害活性が高い。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を含まない培地または低濃度の血清を含んだ培地を用いた LAK 細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0210】

実施例 26 低血清培地 (AIM-V) を用いた LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定 (繰り返し刺激による拡大培養) - 1

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 2 - (1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を 1% Human AB 血清を含む培地 AIM-V に変更した。結果を表 26 に示す。

【0211】

【表 26】

表 26

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日目刺 激	拡大培養率 (倍率)
1%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	なし	×461
1%AIM-V	FNfr 非固定化	抗 CD3	抗 CD3	×130
1%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	×2419

【0212】

表 26 に示されるように、低濃度の血清 (1%) を含んだ AIM-V 培地を用いての LAK 細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗 CD3 抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して LAK 細胞の拡

大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0213】

実施例 27 低血清培地 (AIM-V) を用いた LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定 (繰り返し刺激による拡大培養) - 2

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材 (容器) に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち12穴細胞培養プレートまたは12.5 cm² 細胞培養フラスコ (Falcon社製) に抗ヒトCD3抗体 (終濃度5 μg/ml) を含むPBSを1.9 ml (12穴プレートの場合) または2 ml (12.5 cm² フラスコの場合) ずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載の各フィブロネクチンフラグメント (FNfr) を終濃度10 μg/ml (12穴プレートの場合) または25 μg/ml (12.5 cm² フラスコの場合) となるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、AIM-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0214】

(2) LAK細胞の誘導および培養

1% AIM-V に 5×10^5 cells/ml となるように実施例 1-(1) で調製した PBMC を懸濁後、実施例 27-(1) で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1 ml/ウェルずつまき、終濃度1000 U/ml となるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5% CO₂ 中37℃で培養した (培養0日目)。培養開始後2、3日目には1000 U/ml のIL-2を含む1% AIM-V を1 ml/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない25 cm² 細胞培養フラスコ (Falcon社製) に移し、さらに1% AIM-V 7 ml を添加し、終濃度500 U/ml となるようIL-2を添加した。培養開始7日目には1% AIM-V を用いて細胞濃度を 2×10^5 cells/ml に調整した培養液の一部を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500 U/ml となるようIL-2を添加した。培養開始9日目には実施例 27-(1) と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコ (ただし、固定化に用いる抗ヒトCD3抗体の濃度は0.5 μg/ml とした) に1% AIM-V を用いて細胞濃度を 2×10^5 cells/ml に調整した培養液の一部を移し、終濃度500 U/ml となるようIL-2を添加した。培養開始12日目に再度適宜1% AIM-V を用いて細胞濃度を 2×10^5 cells/ml に調整した培養液の一部を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500 U/ml となるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。同条件にてn=3で拡大培養を行い、その平均±標準偏差の各結果を表27に示す。

【0215】

【表 27】

表 27

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	拡大培養率 (倍率)
1%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	なし	$\times 3392 \pm 779$
1%AIM-V	FNfr 非固定化	抗 CD3	抗 CD3	$\times 4389 \pm 1234$
1%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	$\times 8545 \pm 1328$

平均値±標準偏差

【0216】

表 27 に示されるように、低濃度の血清 (1%) を含んだ AIM-V 培地を用いての LAK 細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗 CD3 抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して LAK 細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK 細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗 CD3 抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。またこれらの効果は培養方法によらず効果が発揮された。すなわち LAK 細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗 CD3 抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率で LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0217】

実施例 28 無血清培地 (AIM-V) を用いた LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率 (繰り返し刺激による拡大培養)

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 2-(1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を Human AB 血清を含まない AIM-V に変更した。

【0218】

(2) LAK 細胞における CD8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4-(2) と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 28 に示す。

【0219】

【表 28】

表 28

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	CD8 陽性細胞含 有率 (%)
0%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	なし	43.8
0%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	なし	64.4
0%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	76.6

【0220】

表 28 に示されるように、血清を含まない AIM-V 培地を用いての LAK 細胞誘導初期または中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中の LAK 細胞後細胞集団における CD8 陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いて LAK 細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK 細胞中の CD8 陽性細胞の含有率を高くしながら LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0221】

実施例 29 低血清培地 (AIM-V) を用いた LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率 (繰り返し刺激による拡大培養)

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 2-(1)と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を 1% Human AB 血清を含む AIM-V に変更した。

【0222】

(2) LAK 細胞における CD8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4-(2)と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 29 に示す。

【0223】

【表 29】

表 29

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	CD8 陽性細胞含 有率 (%)
1%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	なし	39.2
1%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	抗 CD3	60.0
1%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	なし	49.2
1%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	71.0

【0224】

表 29 に示されるように、低濃度の血清を含んだ AIM-V 培地を用いての LAK 細胞誘導初期または中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養後の LAK 細胞集団における CD8 陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いて LAK 細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK 細胞中の CD8 陽性細胞の含有率を高くしながら LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0225】

実施例 30 無血清培地 (AIM-V) を用いた LAK 細胞培養系における IL-2 レセプター (IL-2R) 発現の誘導

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 2-(1)と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を Human AB 血清を含まない AIM-V 培地に変更した。

【0226】

(2) LAK 細胞における IL-2R 発現率の測定

実施例 3-(2)と同様の方法で、IL-2R 発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表 30 に示す。かかる表では IL-2R 発現陽性細胞含有率 (%) を IL-2R 発現率 (%) と表示する。

【0227】

【表 30】

表 30

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	IL-2R 発現率 (%)
0%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	なし	22.0
0%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	抗 CD3	39.9
0%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	なし	19.9
0%AIM-V	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	51.9

【0228】

表 30 に示されるように、血清を含まない AIM-V 培地を用いての LAK 細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養後の LAK 細胞表面上における IL-2R 発現率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いて LAK 細胞を誘導する際にフィブロネクチンフ

ラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0229】

実施例31 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター(IL-2R)発現の誘導(繰り返し刺激による拡大培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1%HumanAB血清を含むAIM-V培地に変更した。

【0230】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表31に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

【0231】

【表31】

表31

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	培養開始0日目刺激	培養開始9日目刺激	IL-2R発現率(%)
1%AIM-V	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	23.6
1%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	27.2
1%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	69.1

【0232】

表31に示されるように、低濃度の血清を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0233】

実施例32 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1%HumanAB血清を含むAIM-V培地に変更した。

【0234】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表32に示す。

【0235】

【表32】

表32

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率(%)
1%AIM-V	対照(FNfr非固定化)	41.02
1%AIM-V	CH-296	56.78

【0236】

表32に示されるように、低血清を含むAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち

低濃度の血清を含む培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0237】

実施例33 無血清・低血清培地を用いたLAK細胞培養系における細胞傷害活性の測定

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)または実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0%または1% Human AB血清を含むXVIVO10、XVIVO20またはAIMV培地に変更した。

【0238】

(2) 培養したLAK細胞の細胞傷害活性の測定

実施例25-(2)と同様の方法で培養後15日目のLAKの細胞傷害活性を測定した。結果を表33に示す。

【0239】

【表33】

表33

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	培養開始 0日目刺激	培養開始 9日目刺激	E/T	細胞傷害 活性(%) 標的細胞 K562	細胞傷害 活性(%) 標的細胞 Daudi
0%XVIVO10	対照 (FNfr 非固定化)	抗CD3	なし	10	11.88	10.84
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	10	19.55	26.23
1%AIM-V	対照 (FNfr 非固定化)	抗CD3	なし	10	16.82	33.02
1%AIM-V	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	10	46.54	42.3
0%XVIVO20	対照 (FNfr 非固定化)	抗CD3	抗CD3	10	24.5	13.3
0%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	10	30.8	23.3
1%XVIVO20	対照 (FNfr 非固定化)	抗CD3	抗CD3	10	18.5	13.9
1%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	10	30.8	28.5
1%XVIVO10	対照 (FNfr 非固定化)	抗CD3	抗CD3	10	13.8	8.4
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	10	33.0	31.8

【0240】

表33に示されるように、血清を含まない培地もしくは低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期または初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の細胞傷害活性が高い。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を含まない培地または低濃度の血清を含んだ培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0241】

実施例34 低血清培地 (XVIVO10) を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定 (細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを用いた培養)

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材 (細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ) に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ (Baxter社製) に抗ヒトCD3抗体 (終濃度5μg/ml) を含むPBSを20mlずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載の各フィブロネクチンフラグメント (FNfr) を終濃度42.5μg/mlとなるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各バッグをPBS

で2回、1% Human AB血清を含むXVIVO10培地（以下1%XVIVO10と略す）で1回洗浄し各実験に供した。

【0242】

(2) LAK細胞の誘導および培養

1%XVIVO10に 1×10^6 cells/mlとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例34-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに10ml/バッグずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2を添加した。これらの細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを5%CO₂中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目には1000U/mlのIL-2を含む1%XVIVO10を20ml/バッグずつ添加した。培養開始4日目には終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始後6日目には1%XVIVO10を30ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釈した後、何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表34に示す。

【0243】

【表34】

表34

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率（倍率）
1%XVIVO10	15日間	対照（FNfr非固定化）	×34
1%XVIVO10	15日間	CH-296	×101

【0244】

表34に示されるように、低濃度（1%）の血清を含んだ培地（XVIVO10）と細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地および細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0245】

実施例35 低血清培地（XVIVO10）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養）

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材（25cm²細胞培養用フラスコ）に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち25cm²細胞培養用フラスコ（コーニング社製）に抗ヒトCD3抗体（終濃度5μg/ml）を含むPBSを6mlずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載の各フィブロネクチンフラグメント（FNfr）を終濃度42.5μg/mlとなるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、1% Human AB血清を含むXVIVO10培地（以下1%XVIVO10と略す）で1回洗浄し各実験に供した。

【0246】

(2) LAK細胞の誘導および培養

1%XVIVO10に 1×10^6 cells/mlとなるように実施例1-(1)で調

製したPBMCを懸濁後、実施例35-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3ml/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後1日目または2日目には1000U/mlのIL-2を含む1%XVIVO10を7ml/フラスコずつ添加した。以下抗CD3抗体±CH296刺激期間により2つの方法で培養した。(i)培養開始後4日目に培養液をなにも固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに移した後、1%XVIVO10を20ml/バッグずつ添加し終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加、さらに培養開始後6日目に1%XVIVO10を30ml/バッグずつ添加後、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した(抗CD3抗体±CH296刺激期間4日間)。(ii)培養開始4日目または5日目に終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加し、培養開始後6日目に培養液をなにも固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに移した後、1%XVIVO10を50ml/バッグずつ添加、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した(抗CD3抗体±CH296刺激期間6日間)。両条件とも培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釈した後、何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表35に示す。

【0247】

【表35】

表35

血清濃度・培地	抗CD3±CH296 刺激期間	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
1%XVIVO10	4日間	15日間	対照(FNfr非固定化)	×235
1%XVIVO10	4日間	15日間	CH-296	×498
1%XVIVO10	6日間	15日間	対照(FNfr非固定化)	×425
1%XVIVO10	6日間	15日間	CH-296	×690

【0248】

表35に示されるように、低濃度(1%)の血清を含んだ培地(XVIVO10)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0249】

実施例36 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(25cm²細胞培養用フラスコ)に実施例35-(1)と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、1%HumanAB血清を含むAIM-V培地(以下1%AIM-Vと略す)で1回洗浄し各実験に供した。

【0250】

(2) LAK細胞の誘導および培養

1% AIM-V に 1×10^6 cells/ml となるように実施例 1-(1) で調製した PBMC を懸濁後、実施例 36-(1) で調製した抗ヒト CD3 抗体固定化フラスコ、または抗ヒト CD3 抗体および FNfr 固定化フラスコに 3 ml/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度 1000 U/ml となるように IL-2 を添加した。これらのフラスコを 5% CO₂ 中 37℃ で培養した (培養 0 日目)。培養開始後 1 日目には 1000 U/ml の IL-2 を含む 1% AIM-V を 7 ml/フラスコずつ添加した。培養開始後 4 日目には培養液を何も固定化していない 85 cm² 細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグに移した後、1% AIM-V を 20 ml/バッグずつ添加し、終濃度 500 U/ml となるよう IL-2 を添加した。培養開始 6 日目には 1% AIM-V を 30 ml/バッグずつ添加し、終濃度 500 U/ml となるよう IL-2 を添加した。培養開始後 8 日目には培養液の一部を適宜希釈した後、何も固定化していない 85 cm² 細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグに移し、終濃度 500 U/ml となるよう IL-2 を添加した。培養開始 11、13 日目には終濃度 500 U/ml となるよう IL-2 を添加した。培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表 36 に示す。

【0251】

【表 36】

表 36

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率 (倍率)
1% AIM-V	15 日間	対照 (FNfr 非固定化)	×327
1% AIM-V	15 日間	CH-296	×566

【0252】

表 36 に示されるように、低濃度 (1%) の血清を含んだ培地 (AIM-V) を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較して LAK 細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0253】

実施例 37 低血清培地 (XVIVO10) を用いた LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率 (細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグを用いた培養)

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 34-(2) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。

【0254】

(2) LAK 細胞における CD8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4-(2) と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 37 に示す。

【0255】

【表 37】

表 37

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	CD8 陽性細胞含有率 (%)
1% XVIVO10	15 日間	対照 (FNfr 非固定化)	45.7
1% XVIVO10	15 日間	CH-296	61.6

【0256】

表 37 に示されるように、低濃度 (1%) の血清を含んだ培地 (XVIVO10) と細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグを用いての LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチン

ラグメントを固定化した細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを使用した群においては、培養後のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。このことから各フィブロネクチンラグメントは低濃度の血清を含んだ培地および細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0257】

実施例38 低血清培地(XVIVO10)を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率(細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例35-(2)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0258】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表38に示す。

【0259】

【表38】

表38

血清濃度・培地	抗CD3±CH296 刺激期間	培養日数	フィブロネクチン ラグメント	CD8陽性細胞含 有率(%)
1%XVIVO10	4日間	15日間	対照(FNfr非固定化)	58.1
1%XVIVO10	4日間	15日間	CH-296	70.3
1%XVIVO10	6日間	15日間	対照(FNfr非固定化)	58.3
1%XVIVO10	6日間	15日間	CH-296	72.7

【0260】

表38に示されるように、低濃度(1%)の血清を含んだ培地(XVIVO10)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較して培養後のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。このことから各フィブロネクチンラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0261】

実施例39 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(培養開始時、継代時の濃度)

LAK細胞培養系における培養開始時および継代時の細胞濃度が拡大培養率に及ぼす影響を確認した。

培養開始時の細胞濃度として 0.5×10^6 cells/mlおよび 1×10^6 cells/mlを設定した。培養4日目の継代細胞濃度として、 0.25×10^5 cells/mlおよび 0.05×10^6 cells/mlを設定した。培養7、9および11日目の継代細胞濃度として、 0.2×10^6 cells/mlおよび 0.5×10^6 cells/mlを設定した。下記表39-1に上記パターンを示す。

【0262】

【表39-1】

表39-1

	培養開始時濃度	培養4日目濃度	培養7、9、11日目濃度
細胞濃度パターン1	0.500	0.025	0.2
細胞濃度パターン2	0.500	0.05	0.2
細胞濃度パターン3	0.500	0.05	0.5
細胞濃度パターン4	1.000	0.025	0.2
細胞濃度パターン5	1.000	0.05	0.2
細胞濃度パターン6	1.000	0.05	0.5

*細胞濃度 ($\times 10^6$ cells/mL)

【0263】

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(容器)に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち24穴細胞培養プレートに抗ヒトCD3抗体(終濃度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$)を含むPBSを1mLずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載のフィブロネクチンフラグメント(CH296)を終濃度 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。対照として、CH296を添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで 4°C で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗ヒトCD3抗体・CH296を含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、RPMI培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0264】

(2) LAK細胞の誘導および培養

1%のヒトAB型血清を含むAIM-Vに細胞濃度パターン1、2および3で培養する区分は 0.5×10^6 cells/mLとなるように、細胞濃度パターン4、5および6で培養する区分は 1×10^6 cells/mLとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH296固定化プレートに1mL/ウェルずつまき、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO₂中 37°C で培養した(培養0日目)。培養開始後2、3日目には1000U/mLのIL-2を含む1%AIM-Vを1mL/ウェルずつ添加した。

培養開始後4日目に細胞濃度パターン1および4で培養する区分は、 0.025×10^6 cells/mLとなるように、また細胞濃度パターン2、3、5、6で培養する区分は、 0.05×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量最大6mL)、何も固定化していない 12.5cm^2 細胞培養フラスコにそれぞれ移した。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始後7、9および11日目には細胞濃度パターン1、2、4および5で培養する区分は、 0.2×10^6 cells/mLとなるように、また細胞濃度パターン3、6で培養する区分は、 0.5×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量最大6mL)、何も固定化していない 12.5cm^2 細胞培養フラスコにそれぞれ移した。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は3連で行った。その平均の各結果を表39-2に示す。

【0265】

【表 39-2】

表 39-2

	培養開始 0 日目刺激	拡大培養率 (倍率)
細胞濃度パターン 1	抗 CD 3	1 4 2 7
	抗 CD 3 + CH 2 9 6	2 6 4 9
細胞濃度パターン 2	抗 CD 3	3 4 0 1
	抗 CD 3 + CH 2 9 6	3 6 9 1
細胞濃度パターン 3	抗 CD 3	7 4 9
	抗 CD 3 + CH 2 9 6	2 5 0 8
細胞濃度パターン 4	抗 CD 3	2 5 6
	抗 CD 3 + CH 2 9 6	4 3 6
細胞濃度パターン 5	抗 CD 3	1 0 9 1
	抗 CD 3 + CH 2 9 6	1 1 7 9
細胞濃度パターン 6	抗 CD 3	n. t.
	抗 CD 3 + CH 2 9 6	4 7 6

n. t. : not tested

【0266】

表 39-2 に示されるように、培養開始時および継代時において種々の細胞濃度での L A K 細胞培養において、いずれの細胞濃度区分においても、対照群 (抗 CD 3 抗体のみによる刺激) と比較して CH 2 9 6 および抗 CD 3 抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、諸状況下で変化する培養開始時および継代時の細胞濃度に対して、CH 2 9 6 により刺激することにより、明らかに高い拡大培養率で L A K 細胞を誘導・培養できることが示された。

【0267】

実施例 40 低血清培地 (A I M V) を用いて培養した L A K 細胞集団中における CD 8 陽性細胞含有比率 (培養開始時、継代時の濃度)

(1) L A K 細胞の誘導および培養

実施例 39 と同様の方法で L A K 細胞を誘導・培養した。

【0268】

(2) L A K 細胞における CD 8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4-(2) と同様の方法で CD 8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 40 に示す。

【0269】

【表 40】

表 40

	培養開始 0 日目刺激	CD8 陽性細胞含有率 (%)
細胞濃度パターン 1	抗 CD3	55
	抗 CD3 + CH296	63
細胞濃度パターン 2	抗 CD3	62
	抗 CD3 + CH296	73
細胞濃度パターン 3	抗 CD3	71
	抗 CD3 + CH296	75
細胞濃度パターン 4	抗 CD3	56
	抗 CD3 + CH296	70
細胞濃度パターン 5	抗 CD3	61
	抗 CD3 + CH296	70
細胞濃度パターン 6	抗 CD3	n. t.
	抗 CD3 + CH296	76

n. t.: not tested

【0270】

表 40 に示されるように、培養開始時および継代時において種々の細胞濃度での LAK 細胞培養において、いずれの細胞濃度区分においても、対照群（抗 CD3 抗体のみによる刺激）と比較して CH296 および抗 CD3 抗体により刺激した群において培養中の LAK 細胞中における CD8 陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち、諸状況下で変化する培養開始時および継代時の細胞濃度に対して、CH296 により刺激することにより、明らかに LAK 細胞中の CD8 陽性細胞の含有率を高くしながら LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【0271】

実施例 41 低血清培地（AIM-V）を用いた LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定（高濃度・高密度培養）

LAK 細胞培養系において、最終培養液量および最終培養面積を極力抑えることができれば、培地、資材および労力を低減することができる。細胞を高濃度、高密度で培養したときの拡大培養率に及ぼす影響を確認した。

継代時の細胞濃度および細胞密度を抑えない区分（普通培養区分）、培養 7 および 10 日目の継代時の細胞濃度を普通培養区分のそれぞれ 1.8 倍および約 6 倍にした区分（高濃度培養区分、ただし細胞密度は濃度に比例して同じく 1.8 倍および約 6 倍となる）、培養 7 および 10 日目の継代時の細胞濃度を普通培養区分のそれぞれ 1.3 倍および約 2.5 倍に、かつ細胞密度をそれぞれ約 3.9 倍および 7.5 倍にした区分（高濃度・高密度培養区分）を設定した。下記表 41-1 に上記各群での継代時細胞濃度および細胞密度を示す。

【0272】

【表41-1】

表41-1

		培養0日目	培養4日目	培養7日目	培養10日目
普通培養区分	細胞濃度 ($\times 10^6$ cells/mL)	0.333	0.050	0.100	0.15
	細胞密度 ($\times 10^6$ cells/cm ²)	0.263	0.024	0.048	0.072
高濃度培養区分	細胞濃度 ($\times 10^6$ cells/mL)	0.333	0.050	0.180	0.893
	細胞密度 ($\times 10^6$ cells/cm ²)	0.263	0.024	0.086	0.429
高濃度・高密度培養区分	細胞濃度 ($\times 10^6$ cells/mL)	0.333	0.050	0.13	0.38
	細胞密度 ($\times 10^6$ cells/cm ²)	0.263	0.024	0.186	0.543

【0273】

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材（容器）に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち12穴細胞培養プレートに抗ヒトCD3抗体（終濃度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を含むPBSを1.9mLずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載のフィブロネクチンフラグメント（CH296）を終濃度 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。対照として、CH296を添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで 4°C で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗ヒトCD3抗体・CH296を含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、RPMI培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0274】

(2) LAK細胞の誘導および培養

各培養区分とも1%のヒトAB型血清を含むAIM-Vに 0.33×10^6 cells/mLとなるように、実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH296固定化プレートに3mL/ウェルずつまき、終濃度 $1000\text{U}/\text{ml}$ となるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO₂中 37°C で培養した（培養0日目）。

培養開始後4日目に各培養区分とも、 0.05×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大6mL）、何も固定化していない 12.5cm^2 細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度 $500\text{U}/\text{ml}$ となるようIL-2を添加した。

培養開始後7日目には、普通培養区分は 0.1×10^6 cells/mLとなるように、高濃度培養区分は 0.18×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大6mL）、何も固定化していない 12.5cm^2 細胞培養フラスコに移した。また、高濃度・高密度培養区分は 0.13×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大9mL）、何も固定化していない 25cm^2 細胞培養フラスコを立てたものに移した。各区分において終濃度 $500\text{U}/\text{ml}$ となるようIL-2を添加した。

培養開始後10日目には、普通培養区分は 0.15×10^6 cells/mLとなるように、高濃度培養区分は 0.893×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大6mL）、何も固定化していない 12.5cm^2 細胞培養フラスコに移した。また、高濃度・高密度培養区分は 0.38×10^6 cells/mLとなるように1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量最大9mL）、何も固定化していない 25cm^2 細胞培養フラスコを立てたものに移した。

各区分において終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。

培養開始後11日目には各区分に終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。

。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は2連で行った。その平均の各結果を41-2に示す。

【0275】

【表41-2】

表41-2

	培養開始0日目刺激	拡大培養率(倍率)
普通培養区分	抗CD3	601
	抗CD3+CH296	2325
高濃度培養区分	抗CD3	112
	抗CD3+CH296	1131
高濃度・高密度培養区分	抗CD3	215
	抗CD3+CH296	1307

【0276】

表41-2に示されるように、普通培養区分あるいは高濃度培養区分あるいは高濃度・高密度培養区分において、いずれの区分においても、対照群(抗CD3抗体のみによる刺激)と比較してCH296および抗CD3抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、培地、資材および労力を低減することができる高濃度・高密度培養においてCH296による刺激により明らかに拡大培養に対する効果が認められた。

【0277】

実施例42 低血清培地(AIMV)を用いて培養したLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率(培養開始時、継代時の濃度)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例41と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

【0278】

(2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表42に示す。

【0279】

【表42】

表42

	培養開始0日目刺激	CD8陽性細胞含有率(%)
普通培養区分	抗CD3	53
	抗CD3+CH296	63
高濃度培養区分	抗CD3	55
	抗CD3+CH296	72
高濃度・高密度培養区分	抗CD3	63
	抗CD3+CH296	65

【0280】

表42に示されるように、普通培養区分あるいは高濃度培養区分あるいは高濃度・高密度培養区分において、いずれの区分においても、対照群(抗CD3抗体のみによる刺激)と比較してCH296および抗CD3抗体により刺激した群において培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち、培地、資材および労力を低減することができる高濃度・高密度培養においてCH296による刺激により、明らかにLAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・

培養することが可能であることが明らかとなった。

【0281】

実施例 43 低血清培地 (AIM-V) を用いた LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定 (血清濃度 0%、0.15%、5%→0.1%)

LAK 細胞培養において 1 回に 30 mL を採血すると、大体 15 mL の血漿が得られる。これを最終 10 L までの培地により培養することを考慮すると、血漿濃度として 0.15% となる。また、5% の血漿濃度から培養を開始すると 4 日目以降、細胞を継代、希釈するときの培地における血漿濃度は 0.1% 程度となる。以上を鑑みて LAK 細胞培養系における血清濃度の影響を確認した。

培養開始時にヒト AB 型血清が 0%、0.15% あるいは 5% それぞれ含まれる区分を設定した。各濃度のヒト AB 型血清を含む AIM-V に 0.33×10^6 cells/ml となるように実施例 1-(1) で調製した PBMC を懸濁後、実施例 41-(1) で調製した抗ヒト CD3 抗体固定化プレート、または抗ヒト CD3 抗体および CH296 固定化プレートに 3 ml/ウェルずつまき、終濃度 1000 U/ml となるように IL-2 を添加した。これらのプレートを 5% CO₂ 中 37℃ で培養した (培養 0 日目)。

培養開始後 4 日目に 0%、0.15% ヒト AB 型血清を含む AIM-V で培養した区分は、最大 0.05×10^6 cells/ml となるように、それぞれ 0% あるいは 0.15% ヒト AB 型血清を含む AIM-V により希釈し、何も固定化していない 12.5 cm² 細胞培養フラスコに移した (液量 2.5 ml)。5% ヒト AB 型血清を含む AIM-V で培養した区分は、 0.05×10^6 cells/ml となるように 0.1% ヒト AB 型血清を含む AIM-V により希釈し (液量 6 mL)、何も固定化していない 12.5 cm² 細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度 500 U/ml となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 7 日目には 0%、0.15% ヒト AB 型血清を含む AIM-V で培養した区分はそれぞれ同濃度の血清を含む AIM-V により 0.11×10^6 cells/ml となるように希釈し、何も固定化していない新しい 25 cm² 細胞培養フラスコを立てたものに移した (液量最大 12.6 mL)。5% ヒト AB 型血清を含む AIM-V で培養した区分は、0.1% ヒト AB 型血清を含む AIM-V により 0.11×10^6 cells/ml となるように希釈し、何も固定化していない新しい 25 cm² 細胞培養フラスコを立てたものに移した (液量最大 12.6 mL)。各区分において終濃度 500 U/ml となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 10 日目には 0%、0.15% ヒト AB 型血清を含む AIM-V で培養した区分はそれぞれ同濃度の血清を含む AIM-V により 0.22×10^6 cells/ml となるように希釈し、何も固定化していない新しい 25 cm² 細胞培養フラスコを立てたものに移した (液量最大 12.6 mL)。5% ヒト AB 型血清を含む AIM-V で培養した区分は、0.1% ヒト AB 型血清を含む AIM-V により 0.6×10^6 cells/ml となるように希釈し、何も固定化していない新しい 25 cm² 細胞培養フラスコを立てたものに移した (液量最大 12.6 mL)。各区分において終濃度 500 U/ml となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は 2 連で行った。その平均の各結果を表 43 に示す。

【0282】

【表 4 3】

表 4 3

血清濃度・培地	培養開始0日目刺激	拡大培養率 (倍率)
0% AIM-V	抗CD3	25
	抗CD3+CH296	322
0.15% AIM-V	抗CD3	42
	抗CD3+CH296	197
5%→0.1% AIM-V	抗CD3	175
	抗CD3+CH296	353

【0283】

表 4 3 に示されるように、各血清濃度を含んだ AIM-V 培地を用いての LAK 細胞培養において、いずれの血清濃度区分においても、対照群（抗 CD3 抗体のみによる刺激）と比較して CH296 および抗 CD3 抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、30 mL 採血を想定した血清濃度における LAK 細胞培養において、CH296 および抗 CD3 抗体により刺激することで、明らかに高い拡大培養率で LAK 細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養における細胞は高濃度・高密度であり、CH296 で刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH296 の有効性が認められた。

【0284】

実施例 4 4 低血清培地 (AIM-V) を用いた LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定 (血清濃度 3%→1%→0%→0%、3%→1%→0.1%→0%、3%→0.5%→0.2%→0.2% (最終培養液量約半量)、3%→0.5%→0.2%→0.05%)

実施例 4 3 と同様の観点で 30 mL 採血を想定し得られる血清濃度を考慮して LAK 細胞培養系における血清濃度の影響を確認した。

ヒト AB 型血清濃度は培養開始時は 3% で、培養 4 日目に 1% あるいは 0.5% ヒト AB 型血清を含む AIM-V 培地で細胞を希釈する群、培養 7 日目に 0%、0.1% あるいは 0.2% ヒト AB 型血清を含む AIM-V 培地で細胞を希釈する群、培養 10 日目に 0%、0.05% あるいは 0.2% ヒト AB 型血清を含む AIM-V 培地で細胞を希釈する群をそれぞれ設定した。下記表 4 4-1 に上記パターンを示す。

【0285】

【表 4 4-1】

表 4 4-1

	培養開始 4 日目	培養開始 7 日目	培養開始 10 日目
血清濃度パターン 1	1%	0%	0%
血清濃度パターン 2	1%	0.1%	0%
血清濃度パターン 3	0.5%	0.2%	0.2%
血清濃度パターン 4	0.5%	0.2%	0.05%

*細胞培養液を希釈する培地に含まれるヒト AB 型血清濃度を示す

【0286】

3% のヒト AB 型血清を含む AIM-V に 0.33×10^6 cells/ml となるように実施例 1- (1) で調製した PBMC を懸濁後、実施例 4 1- (1) で調製した抗ヒト CD3 抗体固定化プレート、または抗ヒト CD3 抗体および CH296 固定化プレートに 3 ml / ウェルずつまき、終濃度 1000 U/ml となるように IL-2 を添加した。これらのプレートを 5% CO₂ 中 37℃ で培養した (培養 0 日目)。

培養開始後 4 日目に血清濃度パターン 1 および 2 で培養する区分は、 0.05×10^6 cells/ml となるように 1% ヒト AB 型血清を含む AIM-V により希釈し (液量 6 mL)、何も固定化していない 12.5 cm² 細胞培養フラスコに移した。血清濃度パ

ターン3および4で培養する区分は、 0.058×10^6 cells/mlとなるように0.5%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量6mL）、何も固定化していない12.5cm²細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。

培養開始7日目には血清濃度パターン1で培養する区分は、 0.28×10^6 cells/mlとなるようにヒトAB型血清を含まないAIM-Vにより希釈し（液量12.6mL）、また血清濃度パターン2で培養する区分は、 0.28×10^6 cells/mlとなるように0.1%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量12.6mL）、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。血清濃度パターン3および4で培養する区分は、 0.48×10^6 cells/mlとなるように0.2%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量12.6mL）、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移した。各区分において終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。

培養開始10日目には血清濃度パターン1および2で培養する区分は、 0.51×10^6 cells/mlとなるようにヒトAB型血清を含まないAIM-Vにより希釈し（液量12.6mL）、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移した。血清濃度パターン3で培養する区分は、 0.839×10^6 cells/mlとなるように0.2%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量12.6mL）、また血清濃度パターン4で培養する区分は、 0.43×10^6 cells/mlとなるように0.05%ヒトAB型血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量12.6mL）、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。

培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は2連で行った。その平均の各結果を表44-2に示す。

【0287】

【表44-3】

表44-2

	培養開始0日目刺激	拡大培養率 (倍率)
血清濃度パターン1	抗CD3	182
	抗CD3+CH296	425
血清濃度パターン2	抗CD3	195
	抗CD3+CH296	430
血清濃度パターン3 (最終培養液量半量)	抗CD3	101
	抗CD3+CH296	242
血清濃度パターン4	抗CD3	190
	抗CD3+CH296	416

【0288】

表44-2に示されるように、各血清濃度を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞培養において、いずれの血清濃度区分においても、対照群（抗CD3抗体のみによる刺激）と比較してCH296および抗CD3抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、30mL採血を想定した血清濃度におけるLAK細胞培養において、CH296および抗CD3抗体により刺激することで、抗CD3抗体単独で刺激するよりも、明らかに高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養における細胞は高濃度・高密度であり、CH296で刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH296の有効性が認められた。

【0289】

実施例45 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の

出証特2004-3085985

測定（細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ ガス透過性バッグを組み合わせた培養）

【0290】

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例36-(2)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。結果を表45に示す。

【0291】

【表45】

表45

血清濃度・培地	抗 CD3 ± CH296 刺激期間	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
1%A IM-V	4日間	15日間	対照 (FNfr 非固定化)	×327
1%A IM-V	4日間	15日間	CH-296	×566
1%A IM-V	6日間	15日間	対照 (FNfr 非固定化)	×371
1%A IM-V	6日間	15日間	CH-296	×425

【0292】

表45に示されるように、低濃度（1%）の血清を含んだ培地（A IM-V）を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0293】

実施例46 新鮮分離PBMCおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（0.5%自己血漿を含むA IM-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ ガス透過性バッグを組み合わせた培養）

(1) PBMCの分離および保存

インフォームド・コンセントの得られたヒト健常人ドナーより採血用注射筒にて30ml採血を実施後、採血液を500×g 20分間遠心し、自己血漿およびバフィーコート層を回収した。回収したバフィーコート層はPBSで希釈後Ficoll-paque（ファルマシア社製）上に重層して500×gで20分間遠心分離した。中間層の末梢血単核細胞（PBMC）をピペットで回収、洗浄した。採取した新鮮分離PBMCはトリパンブルー染色法にて生細胞数を算出して各実験に供した。

回収した自己血漿は56℃30分非働化後、800×gで30分間遠心分離し、その上清を非働化自己血漿として使用した（以下自己血漿と略す）。

【0294】

(2) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材（25cm²細胞培養用フラスコ）に実施例35-(1)と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、A IM-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0295】

(3) LAK細胞の誘導および培養

0.5%自己血漿を含むA IM-V（以下0.5%自己血漿A IM-Vと略す）に1×10⁶ cells/mlとなるように実施例46-(1)で調製した新鮮分離PBMCを懸濁後、実施例46-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3ml/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO₂

中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後1日目には1000U/mlのIL-2を含む0.5%自己血漿AIM-Vを7ml/フラスコずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ(オブティサイトバッグまたはX-Foldバッグ バクスター社製)に移した後、0.5%自己血漿AIM-Vを20ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/AIM-Vを30ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始8日目には培養液の一部を適宜希釈した後、何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ(オブティサイトバッグまたはX-Foldバッグ)に移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表46に示す。

【0296】

【表46】

表46

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	PBMC ドナー	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	A	15日間	対照(FNfr非固定化)	×22
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	A	15日間	CH-296	×259
0.5%自己血漿AIM-V・X -Foldバッグ	A	15日間	CH-296	×360
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	B	15日間	対照(FNfr非固定化)	×34
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	B	15日間	CH-296	×432
0.5%自己血漿AIM-V・X -Foldバッグ	B	15日間	CH-296	×360

【0297】

表46に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグの種類によらずLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0298】

実施例47 新鮮分離PBMCおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞比率の測定(0.5%自己血漿を含むAIM-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

【0299】

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例46-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。培養開始15日目に実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表47に示す。

【0300】

【表47】

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	PBMC ドナー	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	CD8 細胞陽性 比率 (%)
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	B	15日間	対照 (FNfr非固定化)	45.0
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	B	15日間	CH-296	89.8
0.5%自己血漿AIM-V・ X-Foldバッグ	B	15日間	CH-296	90.0

【0301】

表47に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグの種類によらずLAK細胞集団中のCD8細胞陽性比率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0302】

実施例48 新鮮分離PBMCおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(0.5%自己血漿を含むAIM-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(25cm²細胞培養用フラスコ)に実施例35-(1)と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、AIM-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0303】

(2) LAK細胞の誘導および培養

0.5%自己血漿を含むAIM-V(以下0.5%自己血漿AIM-Vと略す)に 1×10^6 cells/mlとなるように実施例46-(1)と同様の方法で調製した新鮮分離PBMCを懸濁後、実施例48-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3ml/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後1日目には1000U/mlのIL-2を含む0.5%自己血漿AIM-Vを7ml/フラスコずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ(オブティサイトバッグ)に移した後、0.5%自己血漿AIM-Vを20ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/AIM-Vを30ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釈した後、何も固定化していない85cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ(オブティサイトバッグ)に移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。また、同様に4日目まで培養した培養液を何も固定化していない180cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに一部(10ml中7ml)移した後、0.5%自己血漿AIM-Vを58ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/AIM-Vを65ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一

部を適宜希釈した後、何も固定化していない 180 cm^2 細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグ (オプティサイトバッグ) に移し、終濃度 500 U/ml となるよう IL-2 を添加した。培養開始 11、13 日目には終濃度 500 U/ml となるよう IL-2 を添加した。この際培養開始 11 日目に 0.5% 自己血漿 / AIM-V を 130 ml 添加する系も設定した。培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表 48 に示す。

【0304】

【表 48】

表 48

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグ	バッグ培養 面積	11 日目 培地添加	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
0.5% 自己血漿 AIM-V ・ オプティサイトバッグ	85 cm^2	なし	15 日間	対照 (FNfr 非 固定化)	$\times 2.2$
0.5% 自己血漿 AIM-V ・ オプティサイトバッグ	85 cm^2	なし	15 日間	CH-296	$\times 2.59$
0.5% 自己血漿 AIM-V ・ オプティサイトバッグ	180 cm^2	なし	15 日間	CH-296	$\times 4.73$
0.5% 自己血漿 AIM-V ・ オプティサイトバッグ	180 cm^2	あり	15 日間	CH-296	$\times 9.11$

【0305】

表 48 に示されるように、低濃度 (0.5%) の自己血漿を含んだ培地 (AIM-V) を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらず LAK 細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0306】

実施例 49 新鮮分離 PBMC および自己血漿含有培地を用いた LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞比率の測定 (0.5% 自己血漿を含む AIM-V 培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 48-(2) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。培養開始 15 日目に実施例 4-(2) と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 49 に示す。

【0307】

【表 49】

表 49

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	バッグ培養 面積	11日目 培地添加	培養日数	フィブロネクチンフ ラグメント	CD8 細胞含有 比率 (%)
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	85cm ²	なし	15日間	対照 (FNfr非固 定化)	37.4
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	85cm ²	なし	15日間	CH-296	70.0
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	180cm ²	なし	15日間	CH-296	56.2
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	180cm ²	あり	15日間	CH-296	58.4

【0308】

表 49 に示されるように、低濃度 (0.5%) の自己血漿を含んだ培地 (AIM-V) を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらず LAK 細胞集団中の CD8 細胞陽性比率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿清を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0309】

実施例 50 新鮮分離 PBMC および自己血漿含有培地を用いた LAK 細胞培養培養系における細胞傷害活性の測定 (0.5% 自己血漿を含む AIM-V 培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 46 - (3) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。

【0310】

(2) 培養した LAK 細胞の細胞傷害活性の測定

実施例 25 - (2) と同様の方法で培養後 15 日目の LAK の細胞傷害活性を測定した。結果を表 50 に示す。

【0311】

【表 50】

表 50

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	E/T	細胞傷害活性 (%) 標的細胞 K562	細胞傷害活性 (%) 標的細胞 Daudi
0.5%自己血漿AIM-V・オ ブティサイトバッグ	15日間	対照 (FNfr非 固定化)	90	50.9	56.2
			30	32.9	49.6
			10	16.9	35.7
0.5%自己血漿AIM-V・オ ブティサイトバッグ	15日間	CH-296	90	75.9	62.3
			30	48.3	53.7
			10	19.6	40.2

【0312】

表 50 に示されるように、低濃度 (0.5%) の自己血漿を含んだ培地 (AIM-V) を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 CO₂ ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較して LAK 細胞の細胞傷害活性が高い。このこと

から各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0313】

実施例51 新鮮分離PBMCおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(0.5%自己血漿を含むAIM-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(25cm²細胞培養用フラスコ)に実施例35-(1)と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、AIM-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

【0314】

(2) LAK細胞の誘導および培養

0.5%自己血漿を含むAIM-V(以下0.5%自己血漿AIM-Vと略す)に 5×10^5 cells/mlとなるように(ただし、生細胞数の計測はチュルク液(関東化学社製)で実施した。)実施例46-(1)と同様の方法で調製した新鮮分離PBMCを懸濁後、実施例51-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3ml/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mlとなるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後1日目には1000U/mlのIL-2を含む0.5%自己血漿AIM-Vを7ml/フラスコずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない180cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグに一部(10ml中7ml)移した後、0.5%自己血漿AIM-Vを58ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/AIM-Vを65ml/バッグずつ添加し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始8日目には培養液の一部を適宜希釈した後、何も固定化していない180cm²細胞培養用CO₂ガス透過性バッグ(オプティサイトバッグ)に移し、終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mlとなるようIL-2を添加した。この際培養開始11日目に自己血漿を含まないAIM-Vまたは0.5%自己血漿/AIM-Vを130ml添加する系も設定した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表51に示す。

【0315】

【表51】

表51

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	PBMC ドナー	11日目 培地添加	11日目 添加 培地	フィブロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	C	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	×570
		なし	なし	CH-296	×1034
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1857
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1882
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	D	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	×947
		なし	なし	CH-296	×1213
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1647
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1832
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	E	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	×743
		なし	なし	CH-296	×931
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1960
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	×1747

【0316】

表51に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(AIM-V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらずLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0317】

実施例52 新鮮分離PBMCおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞比率測定(0.5%自己血漿を含むAIM-V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例51-(2)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。培養開始15日目に実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表52に示す。

【0318】

【表52】

表52

血漿濃度・培地・細胞培養用 CO ₂ ガス透過性バッグ	PBMC ドナー	11日目培 地添加	11日目添加 培地	フィブロネクチン フラグメント	CD8 陽性細 胞率 (%)
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	C	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	59.1
		なし	なし	CH-296	80.8
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	83.3
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	83.6
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	D	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	77.2
		なし	なし	CH-296	83.4
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	84.0
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	85.9
0.5%自己血漿AIM-V・ オブティサイトバッグ	E	なし	なし	対照 (FNfr非 固定化)	72.6
		なし	なし	CH-296	84.6
		あり	0.5%自己血漿 AIM-V	CH-296	86.8
		あり	0%自己血漿 AIM-V	CH-296	89.4

【0319】

表52に示されるように、低濃度（0.5%）の自己血漿を含んだ培地（AIM-V）を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらずLAK細胞集団中のCD8陽性細胞比率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

【0320】

実施例53 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター（IL-2R）発現の誘導

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-（3）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1% Human AB血清を含むAIM-V培地に変更した。

【0321】

(2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-（2）と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表53に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率（%）をIL-2R発現率（%）と表示する。

【0322】

【表 53】

表 53

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	IL-2R発現率 (%)
1%AIM-V	対照 (FNfr非固定化)	23.5
1%AIM-V	CH-296	27.2

【0323】

表53に示されるように、低濃度の血清を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導初期各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0324】

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法によれば、無血清・低血清濃度培地を用いた場合でも、拡大培養率が高く、細胞傷害活性が高く維持され、IL-2Rの発現量が有意に上昇し、CD8陽性細胞の比率が向上した細胞傷害性リンパ球が得られる。当該リンパ球は、例えば、養子免疫療法に好適に使用される。従って、本発明の方法は、医療分野への多大な貢献が期待される。

【図面の簡単な説明】

【0325】

【図1】フィブロネクチンのドメイン構造を示す模式図である。

【配列表フリーテキスト】

【0326】

SEQ ID NO:1 ; Partial region of fibronectin named III-8.
 SEQ ID NO:2 ; Partial region of fibronectin named III-9.
 SEQ ID NO:3 ; Partial region of fibronectin named III-10.
 SEQ ID NO:4 ; Partial region of fibronectin named III-12.
 SEQ ID NO:5 ; Partial region of fibronectin named III-13.
 SEQ ID NO:6 ; Partial region of fibronectin named III-14.
 SEQ ID NO:7 ; Partial region of fibronectin named CS-1.
 SEQ ID NO:8 ; Fibronectin fragment named C-274.
 SEQ ID NO:9 ; Fibronectin fragment named H-271.
 SEQ ID NO:10 ; Fibronectin fragment named H-296.
 SEQ ID NO:11 ; Fibronectin fragment named CH-271.
 SEQ ID NO:12 ; Fibronectin fragment named CH-296.
 SEQ ID NO:13 ; Fibronectin fragment named C-CS1.
 SEQ ID NO:14 ; Fibronectin fragment named CHV-89.
 SEQ ID NO:15 ; Fibronectin fragment named CHV-90.
 SEQ ID NO:16 ; Fibronectin fragment named CHV-92.
 SEQ ID NO:17 ; Fibronectin fragment named CHV-179.
 SEQ ID NO:18 ; Fibronectin fragment named CHV-181.
 SEQ ID NO:19 ; Fibronectin fragment named H-275-Cys.
 SEQ ID NO:20 ; Primer 12S.
 SEQ ID NO:21 ; Primer 14A.
 SEQ ID NO:22 ; Primer Cys-A.
 SEQ ID NO:23 ; Primer Cys-S.

【配列表】
SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Process for the preparation of lymphocyte having cytotoxic activity

<130> T-1903

<160> 23

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-8

<400> 1

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10				15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
			20						25				30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
			35						40				45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
			50						55				60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
			65						70				75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr			
			80						85					

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-9

<400> 2

Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala
1				5					10				15	
Asn	Ser	Phe	Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr
			20						25				30	
Gly	Tyr	Arg	Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro
			35						40				45	
Arg	Glu	Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr
			50						55				60	

Asn	Leu	Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu
				65					70					75
Asn	Gly	Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr
				80					85					90

<210> 3
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> partial region of fibronectin named III-10

<400> 3

Val	Ser	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro
1				5				10						15
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg
				20				25						30
Tyr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val
				35				40						45
Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser
				50				55						60
Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val
				65				70						75
Thr	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile
				80				85						90

Asn Tyr Arg Thr

<210> 4
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> partial region of fibronectin named III-12

<400> 4

Ala	Ile	Pro	Ala	Pro	Thr	Asp	Leu	Lys	Phe	Thr	Gln	Val	Thr	Pro
1				5				10						15
Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Asn	Val	Gln	Leu	Thr
				20				25						30
Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met
				35				40						45
Lys	Glu	Ile	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser
				50				55						60
Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys	Tyr	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu
				65				70						75
Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg	Pro	Ala	Gln	Gly	Val	Val	Thr	Thr
				80				85						90

Leu Glu

<210> 5
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> partial region of fibronectin named III-13

<400> 5
 Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
 20 25 30
 Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile
 35 40 45
 Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60
 Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn
 65 70 75
 Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
 80 85

<210> 6
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> partial region of fibronectin named III-14

<400> 6
 Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro
 1 5 10 15
 Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr
 20 25 30
 Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu
 35 40 45
 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr
 50 55 60
 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
 65 70 75
 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
 80 85 90

<210> 7
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named CS-1

<400> 7

Asp	Glu	Leu	Pro	Gln	Leu	Val	Thr	Leu	Pro	His	Pro	Asn	Leu	His
1				5				10					15	
Gly	Pro	Glu	Ile	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Thr					
				20				25						

<210> 8

<211> 274

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> fibronectin fragment named C-274

<400> 8

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10				15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25				30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40				45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55				60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70				75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85				90	
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100				105	
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115				120	
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130				135	
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145				150	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160				165	
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175				180	
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190				195	
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205				210	
Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220				225	

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270
 Thr Glu Ile Asp

<210> 9
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Human

<220>
 <223> fibronectin fragment named H-271

<400> 9
 Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr
 20 25 30
 Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met
 35 40 45
 Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
 50 55 60
 Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu
 65 70 75
 Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
 80 85 90
 Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala
 95 100 105
 Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr
 110 115 120
 Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr
 125 130 135
 Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
 140 145 150
 Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr
 155 160 165
 Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser
 170 175 180
 Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr
 185 190 195
 Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
 200 205 210
 Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg
 215 220 225
 Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
 230 235 240

Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
 245 250 255
 Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
 260 265 270
 Thr

<210> 10
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> fibronectin fragment named H-296

<400> 10
 Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr
 20 25 30
 Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met
 35 40 45
 Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
 50 55 60
 Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu
 65 70 75
 Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
 80 85 90
 Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala
 95 100 105
 Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr
 110 115 120
 Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr
 125 130 135
 Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
 140 145 150
 Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr
 155 160 165
 Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser
 170 175 180
 Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr
 185 190 195
 Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
 200 205 210
 Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg
 215 220 225
 Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
 230 235 240
 Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
 245 250 255

Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys
 260 265 270
 Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu
 275 280 285
 His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
 290 295

<210> 11

<211> 549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-271

<400> 11

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75
 His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 110 115 120
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
 125 130 135
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 140 145 150
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
 155 160 165
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 170 175 180
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
 185 190 195
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 200 205 210
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg

	245	250	255
Gly Asp Ser Pro	Ala Ser Ser Lys Pro	Ile Ser Ile Asn Tyr	Arg
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp	Lys Pro Ser Met Ala	Ile Pro Ala Pro Thr	Asp
	275	280	285
Leu Lys Phe Thr	Gln Val Thr Pro Thr	Ser Leu Ser Ala Gln	Trp
	290	295	300
Thr Pro Pro Asn	Val Gln Leu Thr Gly	Tyr Arg Val Arg Val	Thr
	305	310	315
Pro Lys Glu Lys	Thr Gly Pro Met Lys	Glu Ile Asn Leu Ala	Pro
	320	325	330
Asp Ser Ser Ser	Val Val Val Ser Gly	Leu Met Val Ala Thr	Lys
	335	340	345
Tyr Glu Val Ser	Val Tyr Ala Leu Lys	Asp Thr Leu Thr Ser	Arg
	350	355	360
Pro Ala Gln Gly	Val Val Thr Thr Leu	Glu Asn Val Ser Pro	Pro
	365	370	375
Arg Arg Ala Arg	Val Thr Asp Ala Thr	Glu Thr Thr Ile Thr	Ile
	380	385	390
Ser Trp Arg Thr	Lys Thr Glu Thr Ile	Thr Gly Phe Gln Val	Asp
	395	400	405
Ala Val Pro Ala	Asn Gly Gln Thr Pro	Ile Gln Arg Thr Ile	Lys
	410	415	420
Pro Asp Val Arg	Ser Tyr Thr Ile Thr	Gly Leu Gln Pro Gly	Thr
	425	430	435
Asp Tyr Lys Ile	Tyr Leu Tyr Thr Leu	Asn Asp Asn Ala Arg	Ser
	440	445	450
Ser Pro Val Val	Ile Asp Ala Ser Thr	Ala Ile Asp Ala Pro	Ser
	455	460	465
Asn Leu Arg Phe	Leu Ala Thr Thr Pro	Asn Ser Leu Leu Val	Ser
	470	475	480
Trp Gln Pro Pro	Arg Ala Arg Ile Thr	Gly Tyr Ile Ile Lys	Tyr
	485	490	495
Glu Lys Pro Gly	Ser Pro Pro Arg Glu	Val Val Pro Arg Pro	Arg
	500	505	510
Pro Gly Val Thr	Glu Ala Thr Ile Thr	Gly Leu Glu Pro Gly	Thr
	515	520	525
Glu Tyr Thr Ile	Tyr Val Ile Ala Leu	Lys Asn Asn Gln Lys	Ser
	530	535	540
Glu Pro Leu Ile	Gly Arg Lys Lys Thr		
	545		

<210> 12

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-296

<400> 12

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg		
1	5	10 15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu		
20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu		
35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu		
50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln		
65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp		
80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360

Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro
 365 370 375
 Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
 380 385 390
 Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp
 395 400 405
 Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys
 410 415 420
 Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr
 425 430 435
 Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
 440 445 450
 Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser
 455 460 465
 Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser
 470 475 480
 Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr
 485 490 495
 Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg
 500 505 510
 Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr
 515 520 525
 Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
 530 535 540
 Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu
 545 550 555
 Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp
 560 565 570
 Val Pro Ser Thr

<210> 13

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named C-CS1

<400> 13

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 80 85 90
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe
 95 100 105
 Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 110 115 120
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
 125 130 135
 Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 140 145 150
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg
 155 160 165
 Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 170 175 180
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu
 185 190 195
 Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 200 205 210
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
 215 220 225
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 230 235 240
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 245 250 255
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 260 265 270
 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr
 275 280 285
 Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro
 290 295 300
 Ser Thr

<210> 14

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-89

<400> 14

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 20 25 30
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg	275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp	290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val	305	310	315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp	320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr	335	340	345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro	350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr	365		

<210> 15

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-90

<400> 15

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
				155					160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
				170					175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
				185					190					195
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg
				200					205					210
Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe
				215					220					225
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys
				230					235					240
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg
				245					250					255
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg
				260					265					270
Thr	Glu	Ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn
				275					280					285
Leu	Arg	Phe	Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp
				290					295					300
Gln	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Gly	Tyr	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu
				305					310					315
Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Glu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro
				320					325					330
Gly	Val	Thr	Glu	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu
				335					340					345
Tyr	Thr	Ile	Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Glu

350
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
365

355

360

<210> 16

<211> 370

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-92

<400> 16

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg	
1				5					10					15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu	
			20						25					30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu	
			35						40					45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu	
			50						55					60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln	
			65						70					75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp	
			80						85					90	
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe	
			95						100					105	
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg	
			110						115					120	
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp	
			125						130					135	
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr	
			140						145					150	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg	
			155						160					165	
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp	
			170						175					180	
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	
			185						190					195	
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg	
			200						205					210	
Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	
			215						220					225	
Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	
			230						235					240	
Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Arg	
			245						250					255	
Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	
			260						265					270	

Thr	Glu	Ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Met	Ala	Ile	Pro	Ala	Pro	Thr	Asp	
				275					280					285	
Leu	Lys	Phe	Thr	Gln	Val	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp	
				290					295					300	
Thr	Pro	Pro	Asn	Val	Gln	Leu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr	
				305					310					315	
Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met	Lys	Glu	Ile	Asn	Leu	Ala	Pro	
				320					325					330	
Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys	
				335					340					345	
Tyr	Glu	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg	
				350					355					360	
Pro	Ala	Gln	Gly	Val	Val	Thr	Thr	Leu	Glu						
				365					370						

<210> 17

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-179

<400> 17

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg	
1				5					10					15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu	
				20					25					30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu	
				35					40					45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu	
				50					55					60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln	
				65					70					75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp	
				80					85					90	
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe	
				95					100					105	
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg	
				110					115					120	
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp	
				125					130					135	
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr	
				140					145					150	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg	
				155					160					165	
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp	
				170					175					180	
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	

185	190	195
Leu Ile Ser Trp	Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly	Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	
215	220	225
Thr Val Pro Gly	Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys	
230	235	240
Pro Gly Val Asp	Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg	
245	250	255
Gly Asp Ser Pro	Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg	
260	265	270
Thr Glu Ile Asp	Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg	
275	280	285
Ala Arg Val Thr	Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp	
290	295	300
Arg Thr Lys Thr	Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val	
305	310	315
Pro Ala Asn Gly	Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp	
320	325	330
Val Arg Ser Tyr	Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr	
335	340	345
Lys Ile Tyr Leu	Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro	
350	355	360
Val Val Ile Asp	Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu	
365	370	375
Arg Phe Leu Ala	Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln	
380	385	390
Pro Pro Arg Ala	Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys	
395	400	405
Pro Gly Ser Pro	Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly	
410	415	420
Val Thr Glu Ala	Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr	
425	430	435
Thr Ile Tyr Val	Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro	
440	445	450
Leu Ile Gly Arg	Lys Lys Thr	
455		

<210> 18

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-181

<400> 18

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1

5

10

15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg	245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp	275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp	290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr	305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro	320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys	335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg	350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro	365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile	380	385	390

Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp
 395 400 405
 Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys
 410 415 420
 Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr
 425 430 435
 Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser
 440 445 450
 Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
 455

<210> 19

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named H-275-Cys

<400> 19

Met Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr
 1 5 10 15
 Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
 20 25 30
 Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys
 35 40 45
 Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser
 50 55 60
 Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser
 65 70 75
 Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly
 80 85 90
 Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg
 95 100 105
 Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr
 110 115 120
 Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala
 125 130 135
 Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg
 140 145 150
 Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile
 155 160 165
 Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val
 170 175 180
 Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe
 185 190 195
 Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro
 200 205 210
 Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly

	215	220	225
Ser Pro Pro Arg	Glu Val Val Pro Arg	Pro Arg Pro Gly Val	Thr
	230	235	240
Glu Ala Thr Ile	Thr Gly Leu Glu Pro	Gly Thr Glu Tyr Thr	Ile
	245	250	255
Tyr Val Ile Ala	Leu Lys Asn Asn Gln	Lys Ser Glu Pro Leu	Ile
	260	265	270
Gly Arg Lys Lys	Thr Cys		
	275		

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 12S

<400> 20

aaaccatggc agctagcgct attcctgcac caactgac

38

<210> 21

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 14A

<400> 21

aaaggatccc taactagtct ttttccttcc aatcag

36

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-A

<400> 22

aaaagcggcc gctagcgcaa gccatgggtct gtttcctgtg

40

<210> 23

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

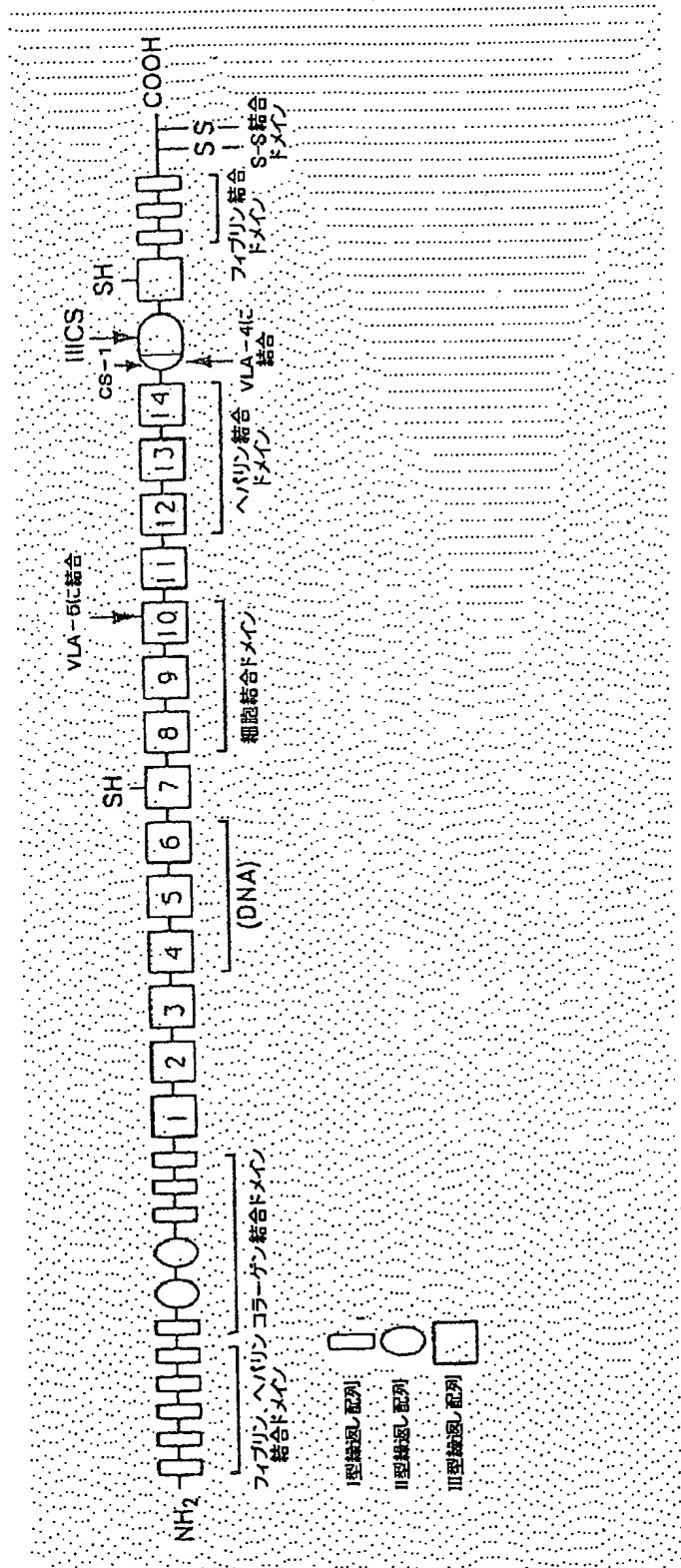
<223> primer Cys-S

<400> 23

aaaagcggcc gcactagtgc atagggatcc ggctgagcaa c

41

【書類名】 図面
【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明の目的は、安全性が高く、医療への使用に適した、細胞傷害活性を高いレベルで保持した細胞傷害性リンパ球を取得する方法を提供することにある。

【解決手段】

血清および血漿の濃度が0～5%未満である培地を用いて、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行う工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法を提供する。本発明の方法は、高い拡大培養率を有し、安全性が高く、さらに患者への負担が軽減された有用な方法である。本発明の方法によりインターロイキン-2レセプターを高発現し、CD8陽性細胞を高比率で含有し、高い細胞傷害活性を有する細胞傷害性リンパ球を得ることができる。

【選択図】 なし

特願2004-222441

出願人履歴情報

識別番号

[302019245]

1. 変更年月日
[変更理由]

2002年 4月 1日

新規登録

住所
氏名

滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
タカラバイオ株式会社

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Process for the preparation of lymphocyte having cytotoxic activity

<130> 04-058-PCTJP

<150> JP 2003-298208

<151> 2003-08-22

<150> JP 2004-699

<151> 2004-01-05

<150> JP 2004-115648

<151> 2004-04-09

<150> JP 2004-222441

<151> 2004-07-29

<160> 29

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-8

<400> 1

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10				15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25				30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40				45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55				60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70				75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr			
				80					85					

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-9

<400> 2

Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala
1				5				10					15	
Asn	Ser	Phe	Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr
				20				25					30	
Gly	Tyr	Arg	Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro
				35				40					45	
Arg	Glu	Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr
				50				55					60	
Asn	Leu	Thr	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu
				65				70					75	
Asn	Gly	Arg	Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr
				80				85					90	

<210> 3

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-10

<400> 3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro

1	5	10	15											
Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg
	20		25		30									
Tyr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val
	35		40		45									
Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser
	50		55		60									
Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Val
	65		70		75									
Thr	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile
	80		85		90									
Asn	Tyr	Arg	Thr											

<210> 4

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-11

<400> 4

Gln	Met	Gln	Val	Thr	Asp	Val	Gln	Asp	Asn	Ser	Ile	Ser	Val	Lys
1		5		10		15								
Trp	Leu	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Thr	Thr

20	25	30
Thr Pro Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly		
35	40	45
Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val		
50	55	60
Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser		
65	70	75
Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr		
80		

<210> 5

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-12

<400> 5

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro		
1	5	10
		15
Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr		
20	25	30
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met		
35	40	45

Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
 50 55 60
 Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu
 65 70 75
 Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
 80 85 90
 Leu Glu

<210> 6

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-13

<400> 6

Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
 20 25 30
 Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile
 35 40 45
 Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly
 50 55 60

Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn
 65 70 75
 Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
 80 85

<210> 7

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence.

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-14

<400> 7

Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro
 1 5 10 15
 Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr
 20 25 30
 Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu
 35 40 45
 Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr
 50 55 60
 Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
 65 70 75
 Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr

80

85

90

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named CS-1

<400> 8

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His

1

5

10

15

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

20

25

<210> 9

<211> 274

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> fibronectin fragment named C-274

<400> 9

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg		
1	5	10 15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu		
	20	25 30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu		
	35	40 45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu		
	50	55 60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln		
	65	70 75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp		
	80	85 90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe		
	95	100 105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg		
	110	115 120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
	125	130 135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
	140	145 150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
	155	160 165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
	170	175 180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		

20	25	30
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met		
35	40	45
Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser		
50	55	60
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu		
65	70	75
Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr		
80	85	90
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala		
95	100	105
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr		
110	115	120
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr		
125	130	135
Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile		
140	145	150
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr		
155	160	165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser		
170	175	180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr		
185	190	195
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile		
200	205	210
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg		

50	55	60
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu		
65	70	75
Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr		
80	85	90
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala		
95	100	105
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr		
110	115	120
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr		
125	130	135
Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile		
140	145	150
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr		
155	160	165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser		
170	175	180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr		
185	190	195
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile		
200	205	210
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg		
215	220	225
Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile		
230	235	240
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala		

245	250	255
Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys		
260	265	270
Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu		
275	280	285
His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr		
290	295	

<210> 12

<211> 549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-271

<400> 12

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg		
1	5	10 15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu		
20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu		
35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu		
50	55	60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg			
	245	250	255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp			
	275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp			
	290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr			
	305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro			
	320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys			
	335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg			
	350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro			
	365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile			
	380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp			
	395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys			
	410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr			
	425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser			
	440	445	450

Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser			
	455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser			
	470	475	480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr			
	485	490	495
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg			
	500	505	510
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr			
	515	520	525
Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser			
	530	535	540
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr			
	545		

<210> 13

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-296

<400> 13

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			

200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro		
365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile		
380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp		

395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys		
410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr		
425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser		
440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser		
455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser		
470	475	480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr		
485	490	495
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg		
500	505	510
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr		
515	520	525
Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser		
530	535	540
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu		
545	550	555
Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp		
560	565	570
Val Pro Ser Thr		

<210> 14

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named C-CS1

<400> 14

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe

95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg

110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp

125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr		
275	280	285
Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro		
290	295	300
Ser Thr		

<210> 15

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-89

<400> 15

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe

95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg

110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp

125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
305	310	315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		

320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
335	340	345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr		
365		

<210> 16

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-90

<400> 16

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg		
1	5	10
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu		
20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu		
35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu		
50	55	60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			
	185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg			
	200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe			
	215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys			
	230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg			
	245	250	255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg			
	260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn			
	275	280	285
Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp			
	290	295	300
Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu			
	305	310	315
Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro			
	320	325	330
Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu			
	335	340	345
Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu			
	350	355	360
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr			
	365		

<210> 17

<211> 370

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-92

<400> 17

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg			
1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
	20	25	30
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
	35	40	45
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
	50	55	60
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln			
	65	70	75
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp			
	80	85	90
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe			
	95	100	105
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg			
	110	115	120
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp			
	125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr			
	140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg			
	155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp			
	170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu			

185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu		
365	370	

<210> 18

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-179

<400> 18

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp

80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe

95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg

110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp		
125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
305	310	315

Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp			
	320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr			
	335	340	345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro			
	350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu			
	365	370	375
Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln			
	380	385	390
Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys			
	395	400	405
Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly			
	410	415	420
Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr			
	425	430	435
Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro			
	440	445	450
Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr			
	455		

<210> 19

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-181

<400> 19

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1				5					10					15
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35					40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50					55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65					70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80					85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95					100					105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110					115					120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
				125					130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
				140					145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg

155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		

350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro		
365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile		
380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp		
395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys		
410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr		
425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser		
440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr		

455

<210> 20

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named H-275-Cys

<400> 20

Met	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Pro	Ala	Pro	Thr	Asp	Leu	Lys	Phe	Thr
1				5					10					15
Gln	Val	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp	Thr	Pro	Pro	Asn
				20					25					30
Val	Gln	Leu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr	Pro	Lys	Glu	Lys
				35					40					45
Thr	Gly	Pro	Met	Lys	Glu	Ile	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser
				50					55					60
Val	Val	Val	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys	Tyr	Glu	Val	Ser
				65					70					75
Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	Asp	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg	Pro	Ala	Gln	Gly
				80					85					90
Val	Val	Thr	Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Ala	Arg
				95					100					105
Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	Ile	Thr	Ile	Ser	Trp	Arg	Thr
				110					115					120
Lys	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr	Gly	Phe	Gln	Val	Asp	Ala	Val	Pro	Ala
				125					130					135
Asn	Gly	Gln	Thr	Pro	Ile	Gln	Arg	Thr	Ile	Lys	Pro	Asp	Val	Arg
				140					145					150
Ser	Tyr	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ile
				155					160					165
Tyr	Leu	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asp	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Val	Val
				170					175					180
Ile	Asp	Ala	Ser	Thr	Ala	Ile	Asp	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Phe
				185					190					195

Leu	Ala	Thr	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gln	Pro	Pro
				200					205				210	
Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Gly	Tyr	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu	Lys	Pro	Gly
				215					220				225	
Ser	Pro	Pro	Arg	Glu	Val	Val	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Thr
				230					235				240	
Glu	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Ile
				245					250				255	
Tyr	Val	Ile	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Glu	Pro	Leu	Ile
				260					265				270	
Gly	Arg	Lys	Lys	Thr	Cys									
				275										

<210> 21

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 12S

<400> 21

aaaccatggc agctagcgct attcctgcac caactgac

38

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 14A

<400> 22

aaaggatccc taactagtct ttttccttcc aatcag

36

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-A

<400> 23

aaaagcggcc gctagcgcaa gccatggctt gtttcctgtg

40

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-S

<400> 24

aaaagcggcc gcactagtgc atagggatcc ggctgagcaa c 41

<210> 25

<211> 658

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-296Na

<400> 25

Met Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val

20 25 30

Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile

35 40 45

Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr

50	55	60		
Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr				
65	70	75	80	
Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile				
	85	90	95	
Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala				
	100	105	110	
Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His				
	115	120	125	
Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser				
	130	135	140	
Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile				
145	150	155	160	
Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln				
	165	170	175	
Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr				
	180	185	190	
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg				
	195	200	205	
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln				
	210	215	220	
Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu				
225	230	235	240	
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg				
	245	250	255	
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr				

260	265	270
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp Asn		
275	280	285
Ser Ile Ser Val Lys Trp Leu Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr		
290	295	300
Arg Val Thr Thr Thr Pro Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys		
305	310	315
Thr Ala Gly Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro		
325	330	335
Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Pro Ser Gly Glu		
340	345	350
Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr		
355	360	365
Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
370	375	380
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro		
385	390	395
Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser		
405	410	415
Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val		
420	425	430
Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly		
435	440	445
Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val		
450	455	460
Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr		

465	470	475	480
Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln			
	485	490	495
Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile			
500	505	510	
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu			
515	520	525	
Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala			
530	535	540	
Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser			
545	550	555	560
Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile			
565	570	575	
Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg			
580	585	590	
Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly			
595	600	605	
Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser			
610	615	620	
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val			
625	630	635	640
Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro			
645	650	655	
Ser Thr			

<210> 26

<211> 1989

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide coding CH-296Na

<400> 26

catatgccca ctgacctgcg attcaccaac attgggtccag acaccatgcg tgtcacctgg	60
gctccacccc catccattga tttaaccaac ttccctgggtgc gttactcgcc tgtgaaaaat	120
gaggaagatg ttgcagagtt gtcaatttct ccttcagaca atgcagtggg ctttaacaaat	180
ctcctgacctg gtacagaata tgtagtgagt gtctccagtg tctacgaaca acatgagagc	240
acacctctta gaggaagaca gaaaacaggt cttgatcccc caactggcat tgacttttct	300
gatattactg ccaactcttt tactgtgcac tggattgctc ctcgagccac catcactggc	360
tacaggatcc gccatcatcc cgagcacttc agtggggagac ctcgagaaga tcgggtgccc	420
cactctcgga attccatcac cctcaccaac ctccactccag gcacagagta tgtggtcagc	480
atcgttgctc ttaatggcag agaggaaagt ccttattga ttggccaaca atcaacagtt	540
tctgatgttc cgagggacct ggaagtgtt gctgcgaccc ccaccagcct actgatcagc	600
tgggatgctc ctgctgtcac agtgagatat tacaggatca cttacggaga aacaggagga	660
aatagccctg tccaggagtt cactgtgcct gggagcaagt ctacagctac catcagcggc	720
cttaaacctg gattgatta taccatcact gtgtatgctg tcactggccg tggagacagc	780
cccgaagca gcaagccaat ttccattaat taccgaacag aaattgacaa accatcccag	840
atgcaagtga ccgatgttca ggacaacagc attagtgta agtggctgcc ttcaagttcc	900
cctgttactg gttacagagt aaccaccact cccaaaaatg gaccaggacc aacaaaaact	960

aaaactgcag gtccagatca aacagaaatg actattgaag gcttgcagcc cacagtggag	1020
tatgtgggta gtgtctatgc tcagaatcca agcggagaga gtcagcctct gggtcagact	1080
gcagtaaccg ctattcctgc accaactgac ctgaagtcca ctcagggtcac acccacaagc	1140
ctgagcgccc agtggacacc acccaatgtt cagctcactg gatatcgagt gcgggtgacc	1200
cccaaggaga agaccggacc aatgaaagaa atcaaccttg ctctgacag ctcctccgtg	1260
gttgtatcag gacttatggg ggccaccaa tatgaagtga gtgtctatgc tcttaaggac	1320
actttgacaa gcagaccagc tcagggtgtt gtcaccactc tggagaatgt cagcccacca	1380
agaagggtc gtgtgacaga tgctactgag accaccatca ccattagctg gagaaccaag	1440
actgagacga tcactggctt ccaagttagt gccgttcag ccaatggcca gactccaatc	1500
cagagaacca tcaagccaga tgcagaagc tacaccatta caggtttaca accaggcact	1560
gactacaaga tctacctgta caccttgaat gacaatgctc ggagctcccc tgtgggtcatc	1620
gacgcctcca ctgccattga tgcaccatcc aacctgcgtt tcttggccac cacacccaat	1680
tcttctctgg tatcatggca gccgccacgt gccaggatta ccggctacat catcaagtat	1740
gagaagcctg ggctctctcc cagagaagtg gtccctcggc cccgccctgg tgtcacagag	1800
gctactatta ctggcctgga accgggaacc gaatatacaa tttatgtcat tggcctgaag	1860
aataatcaga agagcgagcc cctgattgga aggaaaaaga cagacgagct tccccactg	1920
gtaacccttc cacaccccaa tcttcatgga ccagagatct tggatgttcc ttccacataa	1980
tagaagctt	1989

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer CH-296Na1

<400> 27

atcataatgcc cactgacctg cg

22

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer CH-296Na2

<400> 28

ataagcttct attatgtgga agg

23

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer CH-296Na3

<400> 29

accatcactg gctacaggat cc

22



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ (070) 3 40 20 40
FAX (070) 3 40 30 16

**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Generaldirektion 1

Directorate General 1

Direction générale 1

HOSODA, Yoshinori
c/o Hosoda International Patent Office
P.O.Box 26, OMM Building 5th Floor
7-31, Otemae 1-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-6591
JAPON



EPO Customer Services

Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date

05.01.06

Reference	Application No./Patent No. 04772194.9 - 2406 PCT/JP2004012238
Applicant/Proprietor TAKARA BIO INC.	

Entry into the European phase before the European Patent Office

These notes describe the procedural steps required for entry into the European phase before the European Patent Office (EPO). You are advised to read them carefully: failure to take the necessary action in time can lead to your application being deemed withdrawn.

1. The above-mentioned international patent application has been given European application No. **04772194.9**.
2. Applicants **without** a residence or their principal place of business in an EPC contracting state may themselves initiate European processing of their international applications, provided they do so before expiry of the 31st month from the priority date (see also point 6 below).

During the European phase before the EPO as designated or elected Office, however, such applicants must be represented by a professional representative (Arts. 133(2) and 134(1), (7) EPC).

Procedural acts performed after expiry of the 31st month by a professional representative who acted during the international phase but is not authorised to act before the EPO have no legal effect and therefore lead to loss of rights.

Please note that a professional representative authorised to act before the EPO and who acted for the applicant during the international phase does not automatically become the representative for the European phase. Applicants are therefore strongly advised to appoint in good time any representative they wish to initiate the European phase for them; otherwise, the EPO has to send all communications direct to the applicant.

3. Applicants **with** a residence or their principal place of business in an EPC contracting state are not obliged to appoint, for the European phase before the EPO as designated or elected Office, a professional representative authorised to act before the EPO.
However, in view of the complexity of the procedure it is recommended that they do so.
4. Applicants and professional representatives are also strongly advised to initiate the European phase using EPO Form 1200 (available free of charge from the EPO). This however is not compulsory.



5. **To enter the European phase before the EPO, the following acts must be performed.**
(N.B.: Failure validly to do so will entail loss of rights or other adverse legal consequences.)
- 5.1 If the EPO is acting as **designated or elected Office** (Arts. 22(1)(3) and 39(1) PCT respectively), applicants must, within 31 months from the date of filing or (where applicable) the earliest priority date:
- a) Supply a translation of the international application into an EPO official language, if the International Bureau did not publish the application in such a language (Art. 22(1) PCT and Rule 107(1)(a) EPC).
If the translation is not filed in time, the international application is deemed withdrawn before the EPO (Rule 108(1) EPC).
This loss of rights is deemed not to have occurred if the translation is then filed within a two-month grace period as from notification of an EPO communication, provided a surcharge is paid at the same time (Rule 108(3) EPC).
 - b) Pay the national basic fee (EUR 160,00) and, where a supplementary European search report has to be drawn up, the search fee (EUR 960,00 ; Rule 107(1)(c) and (e) EPC).
 - c) If the time limit under Article 79(2) EPC expires before the 31-month time limit, pay the designation fee (EUR 75,00) for each contracting state designated (Rule 107(1)(d) EPC).
 - d) If the time limit under Article 94(2) EPC expires before the 31-month time limit, file the written request for examination and pay the examination fee (EUR 1430,00 ; Rule 107(1)(f) EPC).
 - e) Pay the third-year renewal fee (EUR 380,00) if it falls due before expiry of the 31-month time limit (Rule 107(1)(g) EPC).
- If the fees under (b) to (d) above are not paid in time, or the written request for examination is not filed in time, the international application is deemed withdrawn before the EPO, or the contracting-state designation(s) in question is (are) deemed withdrawn (Rule 108(1) and (2) EPC). However, the fees may still be validly paid within a two-month grace period as from notification of an EPO communication, provided the necessary surcharges are paid at the same time (Rule 108(3) EPC). For the renewal fee under (e) above, the grace period is six months from the fee's due date (Article 86(2) EPC).
- 5.2 If the application documents on which the European grant procedure is to be based comprise more than ten claims, a claims fee is payable within the 31-month time limit under Rule 107(1) EPC for the eleventh and each subsequent claim (Rule 110(1) EPC). The fee can however still be paid within a one-month grace period as from notification of an EPO communication pointing out the failure to pay (Rule 110(2) EPC).
6. If the applicant had a representative during the application's international phase, the present notes will be sent to the representative, asking him to inform the applicant accordingly.
- All subsequent communications will be sent to the applicant, or - If the EPO is informed of his appointment in time - to the applicant's European representative.**



Date

Sheet 3

Application No. 04772194.9

7. For more details about time limits and procedural acts before the EPO as designated and elected Office, see the EPO brochure

How to get a European patent
Guide for applicants - Part 2
PCT procedure before the EPO - "Euro-PCT"

This brochure, the list of professional representatives before the EPO, Form 1200 and details of the latest fees are now all available on the Internet under

<http://www.european-patent-office.org>

RECEIVING SECTION

